Untersuchungen über das Chlorophyll und das Begleitpigment "P 750" der Cyanophycee Anacystis Nidulans

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

KARIN FISCHER

aus Berlin

1968

9798

Untersuchungen über das Chlorophyll und das Begleitpigment "P 750" der Cyanophycee Anacystis Nidulans

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch - naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von

KARIN FISCHER

aus Berlin

1968

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1968

Dekan: Professor Dr. R. Schönenberg

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Metzner

2. Berichterstatter: Dozent Dr. F. Schneider

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Metzner, möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für die Anregungen zur Bearbeitung der vorliegenden Problemstellungen sowie für seine stete wissenschaftliche Förderung sehr herzlich danken.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547604_0120

Gliederung

I. Einleitung 1

II. Experimenteller Teil

A. Methodik

a. Anzucht des Algenmaterials 5

b. Spektroskopie an lebenden Zellen und Zellpartikeln 6

c. Gewinnung der Pigmentrohextrakte 8

d. Spektroskopische Untersuchungen an Pigmentlösungen 9

e. Dünnschichtchromatographie 11

f. Gegenstromverteilung 12

g. Isolierung und Reinigung des "P 750" 18

B. Versuchsergebnisse

a. In vivo Spektren von Anacystis nidulans 21

b. Untersuchungen am Cyanophyceen-Chlorophyll

α) Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Trennungen 26

β) Ergebnisse der Craig-Verteilungen 29

c. Charakterisierung des "P 750" 41

III. Diskussion 47

IV. Zusammenfassung 55

Literaturverzeichnis 56

I. Einleitung

Die Cyanophyceen stellen eine in vielerlei Hinsicht außergewöhnliche Gruppe innerhalb des Pflanzenreiches dar. Die biochemische Zusammensetzung und Struktur ihrer Zellen unterscheidet sich wesentlich von der anderer Organismen. Der Träger der genetischen Informationen, Desoxypentosenucleinsäure, ist diffus im Protoplasma verteilt, ohne durch eine "Kernmembran" von diesem abgetrennt zu sein. Chromosomale Strukturen konnten nicht nachgewiesen werden (DRAWERT 1949, DREWS und NIKLOWITZ 1956). Der Protoplast selbst wurde als Gel hoher Viskosität beschrieben, das weder Plasmaströmung noch Brown'sche Bewegungen eingeschlossener Partikel zeigt. Als vorkommende Vakuolen konnte FOGG (1941) kleine Gasvakuolen nachweisen. Die hohe Viskosität des Plasmas versuchte FOGG (1956) darauf zurückzuführen, daß die Proteinketten weitgehend durch Hauptvalenzbindungen (Disulfidbrücken) miteinander verbunden sind. Damit lägen in der Cyanophyceenzelle andere Diffusionsverhältnisse vor als im normalen Plasma, das seinen Zusammenhalt durch Wasserstoffbrücken erhält. DREWS und MEYER (1964) fanden als Hauptbestandteile der - teilweise strukturierten - Zellwände Mucopolymere.

Diese und eine Reihe weiterer cytologischer und physiologischer Charakteristika finden sich vielfach in der Bakterienzelle wieder. Einander entsprechende Merkmale beider Organismengruppen wurden von PRINGSHEIM (1949) herausgestellt. Hier sei noch verwiesen auf die geringe Größe der Cyanophyceenzelle, die Lage der optimalen Wachstumsraten bei 35-55° C (BÜNNING und HERDTLE 1946) und die verschiedentlich ausgeprägten Resistenzen gegen extrem hohe Temperaturen (GESSNER 1955) sowie gegen Trockenheit (LEVITT 1951). KRATZ und MYERS (1955) fanden für Anacystis nidulans eine Generationszeit von zwei Stunden; dies ist die

höchste Wachstumsrate, die je für eine Alge beschrieben wurde. - Die vorkommenden Photosynthesepigmente sind an der peripheren Region des Protoplasmas auf Thylacoiden angeordnet; die lamelläre Struktur ähnelt der der Chloroplasten, doch sind sie nicht wie diese durch eine Membran vom Plasma abgegrenzt (DREWS und NIKLOWITZ 1956).

Neben obligat phototrophen Organismen, wie Anabaena cylindrica und variabilis (FOGG und WOLFE 1954), Anacystis nidulans und Nostoc muscorum (KRATZ und MYERS 1955) wurden auch chemo-organotrophe Organismen beschrieben, z. B. Nostoc punctiforme (HARDER 1917) und Anabaena cycadeae (WINTER 1935). NAKAMURA (1938) kultivierte eine Oscillatoria-Species, die in Gegenwart von Schwefelwasserstoff keinen Sauerstoff entwickelte, sondern in den Zellen bei gleichzeitiger CO_2-Assimilation Schwefel anreicherte.

Die verschiedenen Möglichkeiten der Energiegewinnung, die innerhalb der Klasse der Cyanophyceen ausgenutzt werden können, weisen diese Algenklasse als eine ursprüngliche aus, innerhalb derer in sehr frühem Evolutionszeitraum, d. h. bevor oxydierende Bedingungen gegeben waren, einige Formen die "echte" Photosynthese "erlernten" (FOGG 1956). TILDEN (1933) vermutete, daß die Pigmentierung der blau-grünen Algen als Adaptation an Farbe und Lichtintensität, wie sie während dieses Evolutionszeitraumes zur Verfügung standen, ihren Ursprung hat. Die für Blau- und Rotalgen charakteristischen Bilichromoproteide zeigen für diese Bedingungen geeignete Absorption. HAXO und BLINKS (1950) fanden für Anabaena und Oscillatoria spec., daß sogar die maximale Ausnutzung der Lichtenergie für die Photosynthese im Wellenlängenbereich der Phycocyaninabsorption liegt.

Mit Ausnahme weniger nicht pigmentierter Formen enthalten die Cyanophyceen als eigentliches Photosynthesepigment Chlorophyll, das mit dem Chlorophyll a höherer Organismen identisch sein soll (SEYBOLD und EGLE 1938). Das Vorkommen von "echtem" Chlorophyll - im Gegensatz zu den Bakteriochlorophyllen und

Chlorobium-Chlorophyllen - ist, wie gezeigt wurde, in dieser Algengruppe noch nicht generell verknüpft mit echter Photosyntheseleistung. Bis heute steht ein wirklich überzeugender Nachweis dafür aus, daß das als Chlorophyll a beschriebene grüne Pigment der Cyanophyceen mit dem Chlorophyll a der Grünalgen und höheren Pflanzen chemisch identisch ist.

Die Bedeutung des Chlorophylls für die Photosynthese ist unumstritten. Wenn es aber als entscheidender Sensibilisator der photochemischen Primärreaktion fungieren soll, so müßte das Wirkungsspektrum der Photosynthese mit dem Absorptionsspektrum des Chlorophylls übereinstimmen. Doch das ist nicht der Fall. Es scheint vielmehr lediglich der Sammlung und Leitung von Lichtquanten zu sog. "Reaktionszentren" zu dienen (DUYSENS 1965, METZNER 1967). Eine heterogene Energieübertragung kann wirksam nur auf ein längerwellig absorbierendes Molekül hin erfolgen (FÖRSTER 1947). Deshalb ist die Suche nach Inhaltsstoffen mit Absorptionsbanden jenseits der des Chlorophylls von besonderem Interesse. Eine Reihe physiologischer Beobachtungen machte gerade die Cyanophyceen hierfür zum geeigneten Versuchsobjekt.

Als erster berichtete DANGEARD (1927) über die Fähigkeit der Cyanophyceen, im Wellenlängenbereich bis zu 740 nm zu assimilieren. Er wies darauf hin, daß es ein Pigment geben müßte, das in diesem Bereich absorbiert. Später fanden NULTSCH und RICHTER (1963) bei 720 nm einen geringen aber signifikanten CO_2-Einbau. Andere Autoren konnten noch bei Wellenlängen bis zu 770 nm phototaktische Einstellbewegungen nachweisen (DREWS 1957).

Mehrfach wurden in den in vivo-Spektren von Cyanophyceen Absorptionsbanden zwischen 730 und 760 nm beobachtet (GOVINDJEE, CEDERSTRAND und RABINOWITCH 1961, GASSNER 1962), denen möglicherweise ein Pigment ("P 750") entspricht, das GASSNER (1962) aus Synechococcus isolieren konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Kombination spektroskopischer Untersuchungen in vivo und in vitro mit Experimenten zur schonenden Fraktionierung von Zellextrakten versucht, einerseits Aufschlüsse über das Chlorophyll der Cyanophycee Anacystis nidulans (Chroococcales) zu gewinnen, andererseits nach einem langwellig absorbierenden Pigment zu suchen, das möglicherweise als "Endstation" der lichtbedingten Energieleitung in Betracht kommt.

II. Experimenteller Teil

A. Methodik

a. Anzucht des Algenmaterials

Die Anzucht der einzelligen Blaualge Anacystis nidulans, die Kulturen der Botanischen bzw. Pflanzenphysiologischen Institute in Göttingen, Frankfurt und Prag entstammte, erfolgte in Durchlüftungsröhren zu je 250 ml Inhalt Zellsuspension. Die Kulturröhren wurden in ein auf 38°C thermostatisiertes Wasserbad eingesetzt. Die Algenanlage entsprach der von LORENZEN (1962) beschriebenen.

Zur Herstellung des Nährmediums wurden den Angaben von KRATZ und MYERS (1955) entsprechende Stammlösungen verwendet. Die Eisen -(II)-sulfat-Titriplex III-Lösung wurde jeweils für 20 l Nährlösung getrennt angesetzt und dem Medium vor Verbrauch in abgemessenen Anteilen zugefügt. Die Algen wurden steril aufgezogen. (Ihre Sterilität wurde mikroskopisch überprüft.) Dazu wurden die Kulturlösungen und -röhren autoklaviert. Die Zellsuspensionen wurden in einem Impfkasten verdünnt, der längere Zeit vor dem Überimpfen (mindestens eine Stunde) mit UV-Licht ausgestrahlt wurde.

Die Anzucht erfolgte im Dauerlicht. Um die Algen mit der erforderlichen Menge an Kohlendioxyd zu versorgen und um ein Absetzen der Zellen zu verhindern, wurden die Kulturen mit einem Luft-CO_2(97:3 Vol.%)-Gemisch begast. Ein höherer CO_2-Gehalt läßt den pH-Wert der Nährlösung, der im neutralen bis schwach alkalischen Bereich liegen soll, zu weit absinken und bedingt ein Absterben der Zellen.

Da verschiedentlich zu beobachten war, daß Anacystis nidulans intensiver Bestrahlung gegenüber empfindlich ist, wurde dafür gesorgt, daß der Lichtgenuß pro Zelle nicht zu

hoch war. Die an einem Brett montierten Leuchtstoffröhren wurden in einem Abstand von 50-60 cm zum Kulturkasten gebracht; in diesem Falle betrug die Beleuchtungsintensität 7000-7500 Lux. Sehr dünne, frisch angeimpfte Suspensionen wurden zusätzlich durch Papierstreifen abgeschattet.- Es erwies sich als günstig, die Kulturen alle 5-6 Tage zu verdünnen.

Nach längerer Kultivierung kann Anacystis nidulans zu fädigen Kolonien auswachsen, die als Phormidium mucicola beschrieben und den Nostocales zugeordnet wurden (LEWIN 1962). Diese mehrzellige Form wurde nicht als Versuchsobjekt verwendet.

b. Spektroskopie an lebenden Zellen und Zellpartikeln.

α) Remissionsspektren: Die Aufnahme von Absorptionsspektren an suspendierten Zellen und Zellpartikeln wird durch die an den licht-absorbierenden Teilchen auftretende Streuung erheblich erschwert. Der Streueffekt verursacht unscharfe Absorptionsbanden, zudem geht ein großer Teil des eingestrahlten Lichtes der Messung verloren. Die Auflösung der Spektren wird mangelhaft. Eine gewisse Abhilfe schaffen die beiden von KUHN (1964) ausgearbeiteten Verfahren (vgl. METZNER (1966a, b)).

1: Das abzentrifugierte Zellmaterial wurde mit Bariumsulfat und Wasser gleichmäßig zu einer lichtundurchlässigen Schicht vermischt. Diese wurde in ein zylindrisches Gefäß gegeben, dessen Boden aus einer Glasplatte bestand, die die Probenöffnung einer Photometerkugel (Remissionsansatz RA3 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen) bedeckte. Die erhaltenen spektralen Daten wurden gegen Standardwerte einer reinen Bariumsulfat-Aufschwemmung korrigiert.

2. Bei der zweiten Methode verblieben die Zellen während der Messung im Kulturmedium. Sie wurden durch eine Durchflußküvette gepumpt, deren Glasfenster der Probenöffnung der Photometerkugel angepaßt und die durch Schläuche mit dem Vorratsgefäß verbunden war. Diese Methode hatte unter anderem den Vorteil, daß die einzelne Zelle jeweils nur eine kurze Zeit der monochromatischen Lichteinwirkung ausgesetzt war, wodurch Schäden durch intensive Belichtung vermieden werden konnten. Dieses Verfahren erschien vor allem geeignet, in-vivo-Spektren aufzunehmen.- Die Meßgenauigkeit erwies sich als sehr hoch, wenn für jeden Meßpunkt genügend Einzelmessungen registriert wurden. Zweifellos treten durch die Spiegelreflektion an der Frontscheibe und durch die seitliche Streuung Fehler auf; diese haben jedoch keinen Einfluß auf die Lage der gemessenen Remissionsminima und -maxima, sondern beeinflussen lediglich die relativen Extinktionswerte. Da jedoch infolge der genannten Fehlerquellen die Gültigkeit der von KUBELKA und MUNK (1931) aufgestellten Funktion zur Berechnung der absoluten Extinktionswerte nicht mehr gesichert erschien, begnügten wir uns damit, relative Remissionswerte aufzunehmen. Die erhaltenen Meßwerte wurden lediglich gegen Standardwerte einer nur mit Wasser gefüllten Durchflußküvette korrigiert.

β) Transmissionsspektren: Normale Transmissionsmessungen sind an Suspensionen nicht möglich.Wohl aber gelingen entsprechende Aufnahmen mit der von HAGEMEISTER (noch unveröffentlicht) entwickelten Spezialküvette, die zu Vergleichsmessungen herangezogen wurde. Ihre Seitenwände bestehen aus spiegelnder Metalloberfläche, so daß an den Zellpartikeln gestreutes Licht an der Küvettenwand mehrfach reflektiert wird, wodurch ein sehr großer Anteil des eingestrahlten Lichtes auf den Empfänger fällt, der durch ein verspiegeltes Rohr mit der Küvette verbunden ist. Die Fenster sind zudem mit Transparentpapier abgeschirmt, um den Anteil des hier regulär reflektierten Lichtes

zu vermindern.- Auch sehr hohe Konzentrationen sind der Messung zugänglich, was für den Nachweis von Farbstoffen, die in den Zellen nur in geringen Mengen vorkommen, von Nutzen ist.

Schon die unmittelbar gewonnenen Meßwerte sind zum Nachweis von Pigmenten in vivo verwendbar. Um die Spektraldaten nach der von HAGEMEISTER angegebenen mathematischen Beziehung auf reine Absorptionswerte korrigieren zu können, ist die Aufnahme von Spektren bei den Konzentrationen c und c/2 erforderlich, sowie die Bestimmung der "Nullwerte" der mit reiner Nährlösung gefüllten Durchflußküvette.- Da die von HAGEMEISTER berechneten Korrekturgleichungen nur im Bereich der Chlorophyll-Absorption zwischen 650 und 690 nm auf ihre Gültigkeit hin überprüft wurden, konnten auch hier nur im langwelligen Absorptionsgebiet den Korrekturen zugängliche Spektren erhalten werden.

Die genaue Meßanordnung zur Aufnahme der Remissions- und Transmissionsspektren entsprach der von KUHN (1964) bzw. HAGEMEISTER (noch unveröffentlicht) beschriebenen.

c. Gewinnung der Pigmentrohextrakte.

Das durch Zentrifugation bei 4800 Umdr./Min. (5100 g) aus der Nährlösung sedimentierte Zellmaterial wurde stets mit 20%igem Aceton vorbehandelt. Ein höherer Acetongehalt, wie er z. B. zur Vorextraktion von Chlorella-Zellen verwendet werden kann, verursachte bei Anacystis nidulans bereits Extraktion von Chlorophyll und Xanthophyllen. Die Vorbehandlung war jedoch unumgänglich zur Eliminierung von Zellwandbestandteilen, die einerseits das Eindringen der unpolaren Extraktionsmittel in die Zelle erschweren und zum anderen die anschließenden Trennverfahren stören.- Die im wäßrigen Aceton suspendierten Algen wurden 10 Minuten bei +5°C

aufbewahrt, des öfteren geschüttelt und bei 4800 Umdr./Min. abzentrifugiert. Das Sediment wurde nun mit dem Hauptextraktionsmittel übergossen und die Suspension in ein dicht zu verschliessendes Gefäß überführt, das bei +5°C verwahrt wurde. Wiederholtes Durchschütteln beschleunigte und vervollständigte den Extraktionsvorgang. Nach etwa 30 Minuten konnte der Extrakt durch Zentrifugieren (4800 Umdr./Min.) vom tiefblau gefärbten Rückstand (phycocyanin-haltig) getrennt werden. Der Extrakt wurde am Vakuum bei +5 - 10°C auf das benötigte Volumen eingeengt; Einengen zur Trockne wurde vermieden. Zur Aufbewahrung wurde die Lösung mit Stickstoff begast und in ein Tiefkühlfach (-5°C) gestellt.

Als Extraktionsmittel zur Gewinnung der Gesamtrohextrakte bewährten sich reines Aceton, 80-90%iges wäßriges Aceton sowie eine Mischung von Aceton und Petroläther im Verhältnis 1:1. Die Menge des verwendeten Lösungsmittels betrug stets das Acht- bis Zehnfache des Volumens der sedimentierten Algen. Die Extraktionsmittel und die Glasgefäße, in denen der Extraktionsvorgang ablaufen sollte, waren bei +5°C vorgekühlt. Die Operationen wurden bei Dämmerlicht vorgenommen.

Die Gewinnung der Rohextrakte aus Chlorella pyrenoidosa erfolgte in gleicher Weise wie die aus Anacystis nidulans; zur Vorbehandlung wurde hier jedoch 40%iges Aceton (vgl. METZNER und SENGER 1962) verwendet.

d. Spektroskopische Untersuchungen an Pigmentlösungen.

α) Für die Aufnahme der Absorptionsspektren sichtbarer und ultravioletter Strahlung standen zwei verschiedene apparative Anordnungen zur Verfügung:

1. Das Spektralphotometer PMQII der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) enthielt als Lichtquellen eine Glühlampe und eine Xenonhochdrucklampe (LX 501) und war mit dem Doppelmonochromator MM12, der über auswechselbare Glas- und Quarzprismensätze verfügte, kombiniert. Je nach verwendeter Lichtquelle und dem zu vermessenden Wellenlängenbereich wurden entsprechende Filter in den Strahlengang gebracht und die Empfänger (Vervielfacher und Photozelle) gewechselt. Am Anzeigegerät wurde der Durchlaßgrad (Transmission) abgelesen und zur Auswertung an Hand von Tabellen in die entsprechenden Extinktionswerte umgerechnet. Die Lösungen befanden sich in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke; es wurde darauf geachtet, daß die Extinktionen der absorbierenden Proben zwischen den Werten 0,2 und 0,7 lagen.

2. Für eine Reihe der (späteren) Messungen stand das registrierende Zweistrahlgerät RPQ 20A/V der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) zur Verfügung. Dieses Gerät, das zunächst mit dem Einfachmonochromator M4QIII ausgestattet war, erhielt in letzter Zeit den Gittermonochromator M9 (Zeiss, Oberkochen). Damit wurde es zu einem Meßgerät, das sich im roten bzw. im nahen infraroten Wellenlängenbereich durch sein hohes Auflösungsvermögen auszeichnete. Es konnte für Absorptionsmessungen im Gebiet von 400 bis 780 nm verwendet werden.

ß) Für die Aufnahme von IR-Spektren stand der Infrarot-Spektrograph (Serie 3) der Firma Ernst Leitz (Wetzlar) zur Verfügung. Das Gerät ist mit einem NaCl-Prisma ausgestattet und enthält eine Einrichtung zur Aufnahme von KBr-Mikropreßlingen. Die Herstellung dieser Preßlinge erfolgte entsprechend der von METZNER (unveröffentlicht) ausgearbeiteten Technik. Als günstig für die Registrierung von Chlorophyll-Spektren erwies sich das Konzentrationsverhältnis von wenigstens 1mg Chlorophyll auf 1g Kaliumbromid (Makropreßling). Für die Herstellung der Mikropreßlinge genügten wenige Mikrogramm. Die auf 1-2 ml eingeengten Lösungen der Proben wurden in einem

Achat-Mörser mit KBr-Pulver fein verrieben, bis das Lösungsmittel vollständig abgedunstet war. Die Präparation der Chlorophyll-Preßlinge wurde im Dämmerlicht vorgenommen. Die Zeit, die für das Evakuieren der Proben aufgewendet wurde, lag zwischen 15 und 60 Minuten. Preßlinge, die nicht sofort vermessen wurden bzw. für Wiederholungsmessungen verwendet werden sollten, wurden über P_2O_5 im Dunkeln aufbewahrt.

Zur Auswertung der erhaltenen Spektren stand die DMS-Kartei des Verlags Chemie (Weinheim, Bergstr.) zur Verfügung. Als weitere Quelle für Vergleichsspektren diente der Sadtler-Katalog.

c. Dünnschichtchromatographie

Zur Fraktionierung von Farbstoffen bot sich zunächst die durch ihre hohe Trennschärfe ausgezeichnete Dünnschichtchromatographie an. Die vorliegenden Versuche wurden sowohl an imprägnierten Schichten als auch rein adsorptiv durchgeführt.- Verwendet wurden 20 x 20 cm Glasplatten, auf die die Sorptionsmittel mit dem Beschichtungsgerät der Firma Camag (Muttenz, Schweiz) aufgebracht wurden. Als solche wurden für reine Adsorptionschromatographie Kieselgel G und Kieselgel HR (Merck, Darmstadt) verwendet, für die imprägnierten Schichten Kieselgur G (Merck). Die Schichtdicken betrugen 0,25 oder 0,30 cm. Die Bereitung der Schichtmaterialien erfolgte nach der von Stahl (1963) angegebenen Vorschrift. Zur Imprägnierung der Kieselgurplatten wurden diese nach dem Trocknen in eine 7%ige Lösung von Triglyceriden (Palmin-Fett : Livio-Öl = 1 : 1) getaucht. An einer der Plattenkanten wurde dabei ein 2 - 3 cm breiter Streifen freigelassen, auf den die Pigmentlösung ent-

weder mit einer Kapillare abgetropft wurde und zwar so, daß eine durchgehende Startlinie entstand, oder mit einer Spritzpistole unter Stickstoff strichförmig aufgetragen wurde.

Als Laufmittel dienten folgende Gemische:

1. Für Kieselgel-Schichten: Petroläther, i-Propanol, Wasser (100 : 10 : 0,25).
2. Für imprägnierte Kieselgur-Schichten: Methanol, Aceton, Wasser (20 : 4 : 3).

Die Chromatographietröge wurden innen mit Filtrierpapier ausgekleidet, um eine vollständige Sättigung der Kammer mit dem Lösungsmitteldampf zu gewährleisten, und während der Trennung verdunkelt.

Als Elutionsmittel wurden für die Chlorophyll-Fraktionen Diäthyläther verwendet, für die Carotinoid-Fraktionen Methanon, n-Hexan oder Chloroform. Die Eluate wurden durch Zentrifugation bei 3000 Umdr./Min. vom Schichtmaterial befreit, direkt spektralphotometrisch vermessen oder unter Stickstoff im Tiefkühlfach (-5°C) aufbewahrt.

f. Gegenstromverteilung.

Das Verteilungsverfahren von CRAIG (1944) bietet sich einmal an zur Gewinnung reiner Substanzen, zum anderen zur Überprüfung der Einheitlichkeit einer Verbindung.

α) Für die Durchführung der Craig-Verteilungen stand die vollautomatische "steady state distribution machine" der Quickfit & Quartz Ltd. (Stone, Staffordshire, England) zur Verfügung, bestehend aus 122 Verteilungselementen, die je 10 ml Ober- und 10 ml Unterphase aufnehmen. Als Sonderanfertigung wurden alle mit Lösungsmitteln in Berührung kommenden Teile aus Pyrex-Glas hergestellt, jedes Röhrchen wurde

mit plangeschliffenen Verschlüssen versehen, alle Verbindungsteile der Ganzglasapparatur wurden mit Kugelschliffen ausgestattet. Da es das Ziel dieses Verfahrens war, absolut reine Präparate zu gewinnen, die IR-spektroskopisch untersucht werden sollten, war die Verwendung von normalem Glas, von Teflonschrauben und -schläuchen sowie von Schliffetten zu vermeiden. METZNER und STRUSS (1963) konnten nachweisen, daß die üblichen Lösungsmittel aus den genannten Materialien Verbindungen extrahieren, die die IR-Spektren empfindlich stören und verfälschen.

Als Phasensystem wurde verwendet: 95%iges Methanol für die Unterphase und Petroläther 40-60° (Merck) für die Oberphase. Das Methanol wurde durch Destillation nachgereinigt, und beide Lösungsmittel wurden an Hand von IR-Spektren auf ihre Reinheit geprüft. Die beiden Phasen wurden in große Scheidetrichter gegegeben, in ihnen wiederholt kräftig durchmischt und mindestens 24 Stunden bei der Raumtemperatur belassen, bei der der Verteilungsprozeß stattfand. Danach wurden die beiden Phasen voneinander getrennt und mit Stickstoff gesättigt. Die Verteilungsbatterie wurde inzwischen mit organischen Lösungsmitteln gereinigt und mit Stickstoff begast, bis keinerlei Lösungsmitteldämpfe mehr wahrzunehmen waren. Unter weiterer Begasung wurden die beiden Phasen in die entsprechenden Reservoirs gefüllt und der Stickstoffstrom noch 15 Minuten durch die Apparatur geleitet. Anschließend konnte das Programm "Unterphasenfüllung" eingeschaltet werden. Nach ca. 5 Stunden waren alle Verteilungselemente mit je10 ml Unterphase gefüllt. Das Programm wurde stets so gewählt, daß sofort nach Beendigung der Unterphasenfüllung die Substanzeingabe in das Anfangsröhrchen r_o erfolgen konnte. Zum Ausgleich eventueller Lösungsmittelverluste, die gelegentlich festzustellen waren (s.u.), wurden die Röhrchen r_1 bis r_{10} zusätzlich mit je 10 ml Oberphase und die Röhrchen r_{11} bis r_{20} mit je 10 ml Unterphase gefüllt.

Der 80-100%ige Acetonextrakt (Herstellung s.o.) wurde mit bidestilliertem Wasser versetzt, bis ein Mindestprozentgehalt

von 50 an Wasser erreicht war und mit reiner Oberphase überschichtet; die beiden Phasen wurden wiederholt durch Schütteln vermischt und voneinander getrennt und so lange mit Wasser gewaschen, bis das Aceton aus der Oberphase vollständig verdrängt war. Einige Xanthophylle blieben bei diesem Vorgang in der Unterphase zurück. Die Oberphase wurde bei +5 bis 10°C auf genau 10 ml eingeengt und in das Verteilungselement r_o überführt. Sodann wurde die Apparatur verdunkelt und der Oberphasentransport in Richtung $r_o \rightarrow r_{122}$ gestartet.- Programmiert wurden bis zu 175 Zyklen. Die Schüttelzeiten betrugen 2,5 Minuten bei 16 Schüttelbewegungen pro Minute, die Absetzzeiten betrugen 1,5 Minuten. Somit dauerte ein Zyklus (Oberphasenübertragung von r_n nach r_{n+1}) rund 6 Minuten.

Da die Planschliffe der Apparatur leider keine zuverlässige Dichtung boten, wurden bei Versuchen, die der quantitativen Analyse der Chlorophyll-Fraktionen dienen sollten, quadratische, 0,025 cm dicke Polyäthylenfolien zwischen die Planschliffe aller Verteilungselemente gelegt. Wurden diese Folien über mehrere Tage mit organischen Lösungsmitteln gewaschen, so waren nach ihrer Verwendung in Fraktionen mit reinen Phasen (Vorlauf) keine IR-spektroskopisch nachzuweisenden Verunreinigungen festzustellen. Es mußte jedoch darauf geachtet werden, daß die Folien während des Trennvorganges nicht austrocknen. Durch den Phasenvorlauf wurden sie durchfeuchtet und blieben feucht, wenn der Trennprozeß nicht unterbrochen wurde. Standen die Phasen längere Zeit über den Schliffen, so nahmen die Folien einen geringen Anteil an Farbstoffen auf. Nach beendeter Verteilung wurde die Apparatur deswegen in Kippstellung belassen; die Fraktionen in den Verteilungselementen waren so der Entnahme durch Pipettieren zugänglich.

Nach 122 Zyklen befanden sich an der Front in der Oberphase die Carotine. Da nur die Chlorophyll-Fraktion ausgewertet werden sollte, wurden die Oberphasentransporte fortgesetzt und die carotin-haltigen Fraktionen am Ende der Verteilungs-

batterie einer Vorlage zugeleitet. Nach ungefähr 175 Übertragungen hatte die Chlorophyll-Fraktion gerade das Ende der Batterie erreicht.- Theoretisch hätte es sich nun angeboten, die Oberphasen von r_{122} nach r_0 zurückzuleiten und das Chlorophyll im Kreisverfahren weiter aufzutrennen. Dazu wäre eine Unterbrechung des Trennvorganges unumgänglich gewesen. Es hätten wenigstens einem Drittel der Röhrchen die carotinoidhaltigen Unterphasen entnommen werden müssen, sie hätten durch Pipettierer gereinigt, getrocknet und mit reiner Unterphase nachgefüllt werden müssen. Dieser Vorgang hätte mindestens zwei Stunden Arbeitszeit erfordert. Während dieser Unterbrechung wäre die Wahrscheinlichkeit, daß Lösungsmittelverluste entstehen und durch den eindringenden Luftsauerstoff die Dampfdruckverhältnisse in der gesamten Apparatur verändert würden, zu groß. Da eine Kontinuität des gesamten Trennvorganges nicht gewährleistet zu sein schien, wurde auf diese Variante verzichtet.

8) Aufnahme von Chlorophyll-Verteilungskurven: Bei genügend großer Anzahl an Verteilungsschritten erfolgt die Verteilung einer Substanz nach statistischen Gesetzmäßigkeiten. An Hand des Verteilungskoeffizienten kann bei bekannter Zahl der Verteilungsschritte die Lage des Konzentrationsmaximums innerhalb der Fraktion bestimmt werden. Dieser Wert gibt gleichzeitig den Kulminationspunkt einer Gauß'schen Glockenkurve an. In gleichen Abständen beiderseits des Maximums muß die Substanz demzufolge in gleichen Konzentrationen vorliegen. Liegt eine einheitliche reine Verbindung vor, so müssen die ermittelten Konzentrationen mit den zu berechnenden theoretischen Werten übereinstimmen.

Bei Farbstoffen bietet es sich an, deren Konzentration durch Extinktionsmessungen zu bestimmen. In den durchgeführten Versuchen wurde so verfahren, daß sofort nach Beendigung des Trennvorganges jedem Verteilungsselement, das sichtbar Chlorophyll enthielt, je 1 ml Ober- und Unterphase entnommen wurden. Bei der gemeinsamen Auswertung beider Phasen einer Fraktion

wurden die entnommenen zwei Milliliter in einen Meßkolben überführt. Durch Zugabe von 1 ml Aceton wurde die Phasentrennung aufgehoben, die in beiden Phasen eines Verteilungselementes gelösten Stoffe wurden somit einer additiven Auswertung zugänglich gemacht. Die weitere Zugabe von Aceton bei zunehmender Farbstoffkonzentration ermöglichte die Bestimmung der Extinktion in günstigen Bereichen. Die Meßreihen wurden mit dem Spektralphotometer RPQ 20A/V durchgeführt, die Vergleichslösungen wurden, ausgehend von der Zusammensetzung Oberphase : Unterphase : Aceton = 1 : 1 : 1, durch Zugabe von Aceton auf den gleichen Verdünnungsgrad eingestellt, wie er für die Proben verwendet wurde.- Zu vermessen waren jeweils 40 Proben, entsprechend [illegible] wurden zum gleichen Zeitpunkt entnommen und bis zur Messung bei +5°C aufbewahrt.

Für die getrennte Auswertung der Konzentrationen in Ober- und Unterphase eines Verteilungselementes wurden je 1 ml Oberphase und 1 ml Unterphase in je einen Meßkolben überführt. In diesem Fall wurden die entnommenen Oberphasen mit reiner Oberphase verdünnt und gegen diese vermessen, analog wurden die Unterphasen behandelt.- Der Grad der Verdünnung wurde bei der Auswertung entsprechend berücksichtigt.

Die experimentelle Verteilungskurve der Chlorophyll-Gesamtfraktion wurde erhalten, indem die gemessenen Extinktionswerte als Funktion der Röhrchennummer (steigend) graphisch aufgetragen wurden.

Als Anleitung zur Auswertung der experimentellen Kurven und zu Berechnung der theoretischen Kurven dienten die Schriften von HECKER (1955) und RAUEN und STAMM (1953). Der theoretische Wert T für das Verteilungselement der Röhrchennummer r bei der Gesamtzahl an durchgeführten Verteilungsschritten n wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_{n,r} = \frac{1}{\sqrt{2\pi npq}} \cdot e^{\frac{-r^2}{2npq}} \qquad (Gl.\ 1)$$

Die Werte p und q ließen sich an Hand des Verteilungskoeffizienten berechnen (s. Gl. 3). Der Verteilungskoeffizient G ist gegeben durch Gleichung 2:

$$G = \frac{r_{max} + 0{,}5}{n - r_{max} + 0{,}5} \qquad \text{(Gl. 2)}$$

$$p = \frac{G}{1 + G} \quad ; \quad q = \frac{1}{1 + G} \qquad \text{(Gl. 3)}$$

Die nach Gleichung 1 erhaltenen Werte wurden durch Multiplikation mit dem Faktor $F = \frac{y_{n,r_{max}}}{T_{n,r_{max}}}$ auf den Maximalwert der experimentellen Kurve $y_{n,r_{max}}$ bezogen.- Unabhängig von Gleichung 2 kann die Verteilungszahl auch aus den Konzentrationen benachbarter Fraktionen berechnet werden (s. Gleichung 4).

$$G = \frac{y_{n,r}}{y_{n,r-1}} \cdot \frac{r}{n + 1 - r} \qquad \text{(Gl. 4)}$$

Charakteristisch für die Verteilung zweier Substanzen ist ihr Trennfaktor β, definiert als das Verhältnis ihrer Verteilungskoeffizienten.- Die Bezeichnungen "Verteilungszahl" und "Verteilungskoeffizient" sind in den durchgeführten Verteilungen gleichbedeutend.

g. Isolierung und Reinigung des "P 750".

Zunächst wurde versucht, mit den üblichen Extraktionsmitteln wie Aceton, Methanol, Petroläther, Diäthyläther, Pyridin, Tetrahydrofuran und Dimethylformanid das in vivo bei 750 nm absorbierende Pigment in Lösung zu bringen. Es war in den genannten Extrakten nicht nachzuweisen. Die Reflektionsmessungen an extrahierten Zellrückständen zeigten die unveränderte Ausprägung des Absorptionsmaximums bei 750 nm. Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit verdünnter Salzsäure und 3%iger Essigsäure bei 30-50°C zur Extraktion des Farbstoffes, in diesen Lösungen begleitet von Phycocyanin. Weiterhin erwiesen sich Dimethylsulfoxyd und Propylenoxyd (Schuchardt) als geeignete Extraktionsmittel. Letzteres wurde ebenfalls von GASSNER (1962) für die Extraktion des "P 750" aus Synechoccocus verwendet und zeigte auch in den vorliegenden Versuchen günstiges Lösungsverhalten.

Die Tatsache, daß z. B. Aceton zwar Chlorophyll und Carotinoide extrahiert, das "P 750" aber nicht nennenswert angreift, wurde insofern genutzt, als durch die Behandlung mit Aceton das "P 750" in den Zellrückständen relativ angereichert werden konnte. Eine Vorextraktion mit 20%igem Aceton wurde auch hier zum Aufschluß der Zellwände durchgeführt. Der nach gründlicher Behandlung mit Aceton erhaltene Zellrückstand konnte mit reinem Prophylenoxyd nur extrahiert werden, wenn das Zellmaterial nach der Acetonextraktion gründlich mit Wasser durchfeuchtet wurde.- Da der Prophylenoxydextrakt neben dem "P 750" noch Chlorophyll und Carotinoide enthielt, war eine weitere Fraktionierung unumgänglich. Dazu wurde die Pigmentlösung eingeengt, in Methanol aufgenommen und in einen Scheidetrichter überführt. Da sich der zu isolierende Farbstoff in verschiedenen Verteilungsgemischen - wie durch Vorversuche ermittelt wurde - stets lipophob verhielt, konnten Lösungsmittel gewählt werden, die das Pigment in der zunehmend

wäßrigen Unterphase beließen und aus dieser die übrigen Begleitpigmente aufnahmen.

Die wäßrige methanolische Lösung wurde zunächst mit einem Gemisch Petroläther : Aceton = 5 : 4 behandelt. Die Oberphase nahm bevorzugt gelbe Farbstoffe auf. Sie wurde so lange dekantiert und durch reine Lösung ersetzt, bis deren Extraktionswirksamkeit erschöpft war. Danach wurde die wäßrige Unterphase mit Diäthyläther überschichtet, der bevorzugt Chlorophyll aufnahm; der Ausschüttelprozeß wurde so lange fortgesetzt, bis keine Farbstoffe mehr von der Oberphase aufgenommen wurden. Abschließend wurde mit n-Hexan nachgewaschen. Die Unterphase wurde vorsichtig bei 30°C eingengt und in reinem Methanol aufgenommen.

Zur Prüfung auf noch vorhandene Begleitsubstanzen wurde die Probe an Kieselgel-Schichten chromatographiert. Hierzu erwies sich ein Gemisch von o-Dichlorbenzol : Äthanol = 4 : 1 als Laufmittel geeignet. Die sichtbar gelb gefärbte Pigmentzone wurde mit Methanol eluiert und von diesem Eluat ein IR-Spektrum aufgezeichnet. Wie zu erwarten, war das Spektrum durch aus dem Schichtmaterial stammende Substanzen stark verunreinigt.

Im folgenden wurde versucht, das Schichtmaterial, Kieselgel HF (Merck), nachzureinigen. Hierzu wurde das Gel im Soxleth 5 x 10 Stunden mit mehrfach gewechseltem Aceton p. a. extrahiert.[x)] Der Acetonextrakt wurde regelmäßig auf Verunreinigungen geprüft. Nach 40stündiger Extraktion entsprach das IR-Spektrum weitgehend dem Spektrum des reinen Acetons. Das Schichtmaterial wurde sofort nach Abdunsten des Acetons auf die Dünnschichtplatten gebracht. Dies geschah in einem von allen übrigen Laboratoriumsarbeiten isolierten Raum. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und die Extrakte aufgetragen und chromatographiert. Die Laufzeit betrug 40-45 Minuten. Die Platten wurden eine Stunde bei Zimmertemperatur und anschließend 30 Minuten bei +30°C getrocknet.

---

x) Für diesen Ratschlag bin ich Herrn Dr. R. Kaiser (Ammoniak-Labor der BASF, Ludwigshafen) zu Dank verpflichtet.

Ein mittels Dimethylsulfoxyd gewonnener Extrakt diente für die massenspektroskopischen Untersuchungen.- Das methanolische Eluat wurde zur Entfernung von Lösungsmittelrückständen säulenchromatographiert. Als Trägermaterial diente hierzu infrarot-transparentes KBr. (METZNER unveröffentlicht). Das Eluat wurde mit einem kleinen Anteil KBr verrieben und mit diesem auf die Säule gebracht, die mit Methanol durchfeuchtet und mit Methanol entwickelt wurde. Die den Farbstoff enthaltende Fraktion wurde direkt in KBr aufgefangen und mit diesem sofort verrieben. Das pigment-haltige KBr konnte für die Herstellung eines Mikropreßlings verwendet werden.

In analoger Weise wurde die Vergleichssubstanz behandelt, die durch Eluieren der nicht pigmentierten Randzone des Kieselgel-Chromatogramms erhalten wurde.

Die KBr-Preßlinge konnten nach Registrierung des IR-Spektrums wieder zermahlen werden, der pigmenthaltige Anteil wurde mit Methanol eluiert und diente weiteren spektroskopischen Untersuchungen.

B. Versuchsergebnisse

a. In vivo Spektren von Anacystis nidulans

Mit der von METZNER (1966a, b) beschriebenen Durchflußküvette konnte das Spektrum im Bereich der Wellenlängen 400-700 nm untersucht werden. Abbildung 1 zeigt das gegen Nährlösung korrigierte Remissionsspektrum. In Abbildung 2 ist das Rot-Band der Chlorophyll-Absorption in größerem Maßstab aufgezeichnet; im Bereich von 660 bis 682 nm wurden hier die Meßpunkte im Abstand von 1 nm ermittelt. Jeder der einzelnen Werte wurde als Mittelwert von fünf Ablesungen erhalten. Die Feinstruktur (vier Banden bzw. Schultern) blieb gleich, unabhängig davon, ob fünf Ablesungen hintereinander bei ein und derselben Wellenlängeneinstellung erfolgten oder ob eine kontinuierliche Messung von 660-680 nm fünfmal wiederholt wurde. Ihre Ausprägung war jedoch abhängig von der Zelldichte der Algensuspension. Bei sehr niedriger Zellzahl blieb das erste Minimum bei 673-674 nm erhalten, im längerwelligen Teil der Bande trat aber nur ein weiteres, breites Minimum zwischen 675 und 681 nm auf.

Bei Wellenlängen jenseits 720 nm fielen die Remissionswerte bis zu einem Minimum bei 750 nm wieder ab ("P 750") und zeigten ein zweites Minimum bei 765 nm.

Zum Vergleich konnte in letzter Zeit die von HAGEMEISTER (unveröffentlicht) ausgearbeitete Meßmethode herangezogen werden. Die nicht korrigierten Spektren stimmten weitgehend mit den Remissionsmessungen überein. Durch die von ihm berechneten Korrekturgleichungen wurden die Werte für Streuung und Absorption der Anacystis-Zellen analysiert (vgl. Abb. 3).

In Tabelle 1 sind die nach beiden Methoden erhaltenen Meßwerte für die Lage der Absorptionsmaxima zusammengefaßt.

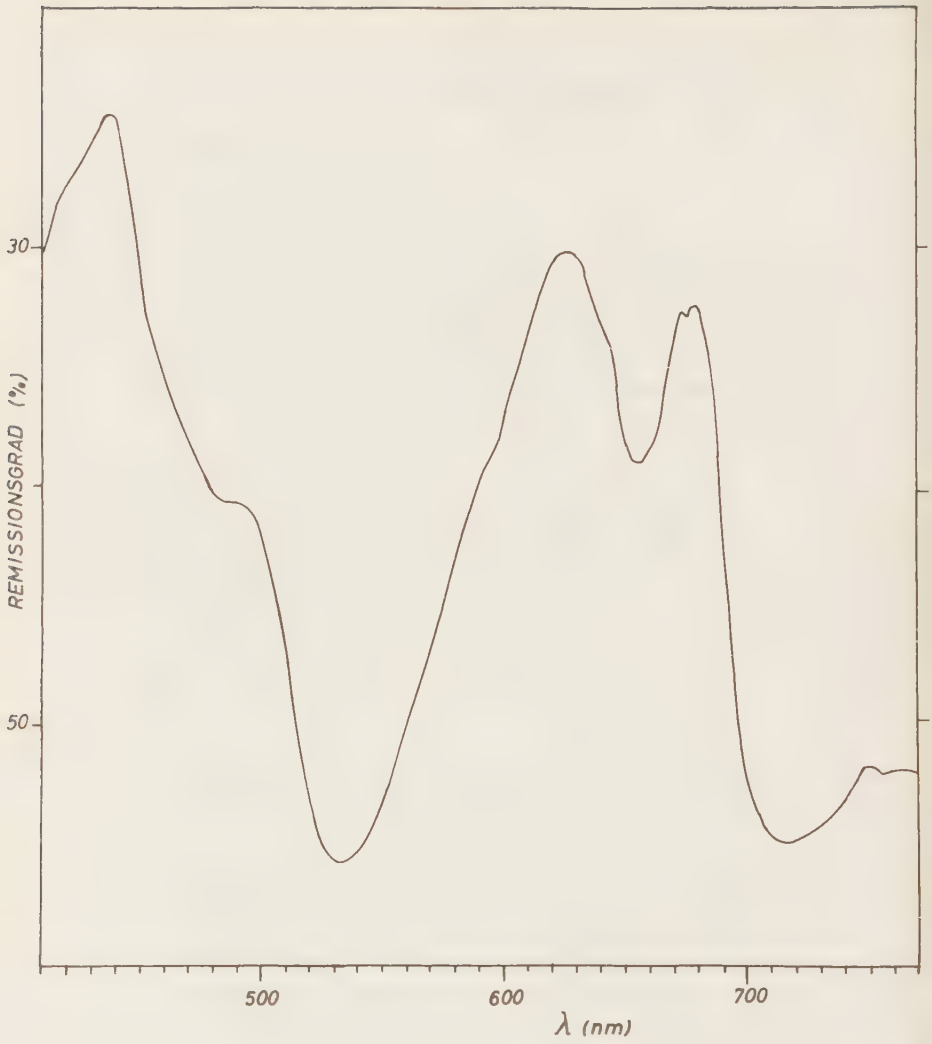


Abb. 1: Remissionsspektrum von Anacystis nidulans in vivo

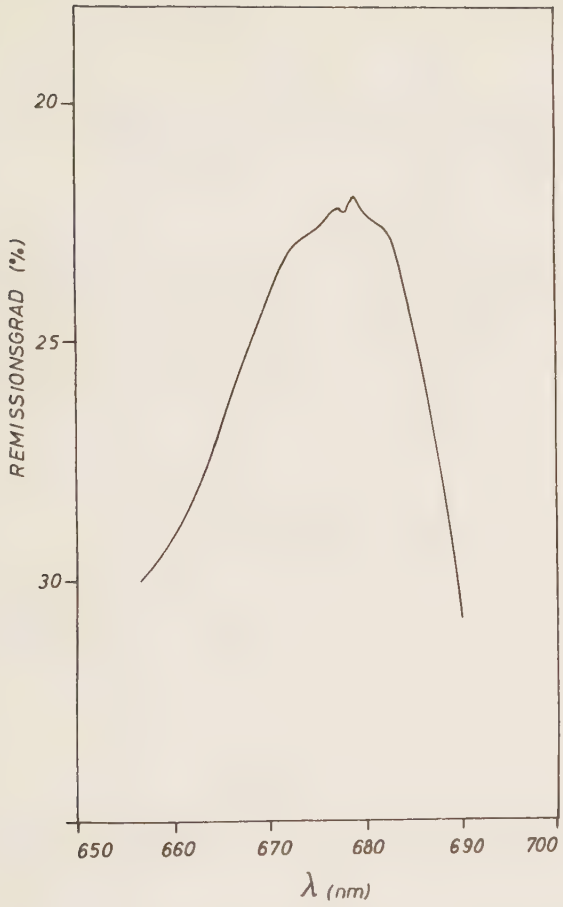


Abb. 2: Feinstruktur der Chlorophyll-Rotbande von Anacystis nidulans (Remissionsspektrum)

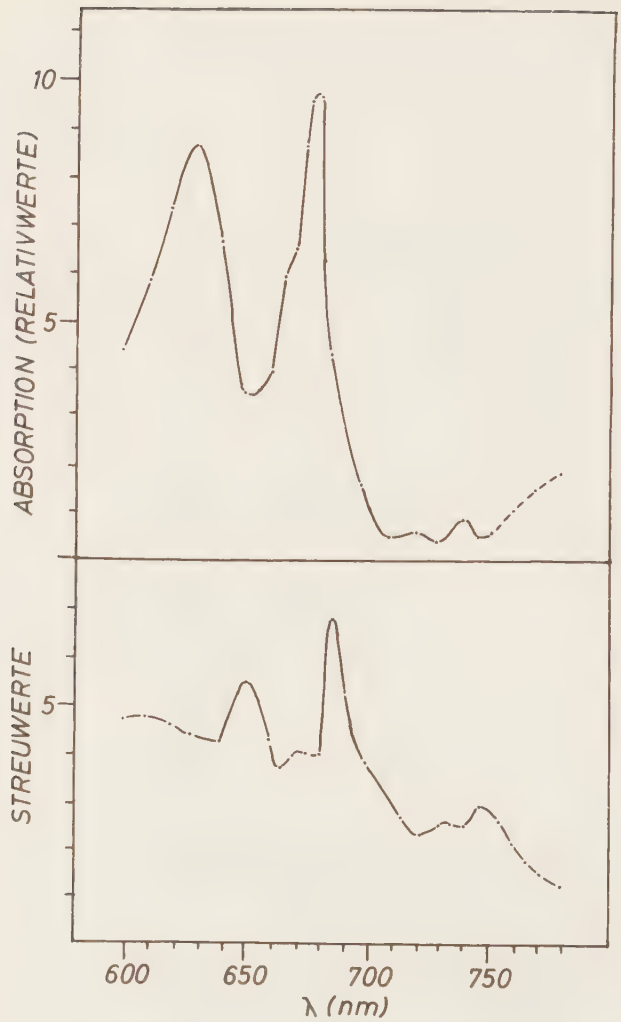


Abb. 3: Absorptionskurve (I) und Streukurve (II) von Anacystis nidulans in vivo (Methode n. Hagemeister)

Tabelle 1

Absorptionsmaxima (nm) von Anacystis nidulans
in vivo im Bereich 600-780 nm

Pigment		Remission	Transmission	
			Streuwerte	Absorptions-werte
Phycocyanin		(595), 620-630	650	630-635
Chlorophyll	1	673-674	670-675	667-668
	2	677	-	-
	3	679	-	-
	4	681-682	680-685	678
"Far red" Pigmente	A	710-715	700-710	-
	B	730	730	720
	C	750	745-750	740
	D	765	-	-

b. Untersuchungen am Cyanophyceen-Chlorophyll.

α) Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Trennungen.

Bei Verwendung der genannten Adsorptionsschichten und Laufmittel zeigten die fettimprägnierten Kieselgur-Platten stets höheres Trennvermögen. Das chromatographische Muster der gelben Pigmente wies für die Blaualgen eine geringere Vielfalt an Carotinoiden nach als für die Chlorophyceen. β-Carotin, Zeaxanthin und evtl. Lutein scheinen in beiden Algenklassen vorzukommen. Auf ihre genaue Identifizierung und die Analyse weiterer gelber Pigmentzonen wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.- Eine dem Chlorophyll b entsprechende Zone trat bei Anacystis nicht auf.

Die Chlorophyll a-Fraktionen beider Algen zeigten auf den verwendeten Schichten unterschiedliches Verhalten. Während bei den Auftrennungen an Kieselgel stets nur eine Chlorophyll a-Zone auftrat, waren diese im Kieselgur-Chromatogramm jeweils in zwei Fraktionen aufgespalten; die zweite, unter der Hauptbande liegende Zone war nicht immer gleich stark vertreten und ausgeprägt, ihre Abtrennung von der Hauptbande war bei Anacystis-Extrakten oft deutlicher als bei Chlorella-Extrakten.

Tabelle 1 gibt die R_F-Werte der Chlorophyllhaupt- und -begleitfraktionen (Chl. aI, Chl. aII) beider Organismen wieder. (Die Bezeichnungen Chl. aI und Chl. aII wurden lediglich herangezogen, um eine übersichtliche Auswertung zu ermöglichen.) Die R_F-Werte der Kieselgur-Chromatogramme wurden auf die Grenze der imprägnierten Schicht als Startlinie bezogen. Da diese Platten schwerer zu standardisieren sind als Kieselgel-Platten, differieren ihre R_F-Werte stärker, sind jedoch innerhalb der angegebenen Grenzwerte reproduzierbar.- Die Werte lassen erkennen, daß die Chlorophylle aI und aII der Chlorophyceen keine Unter-

schiede in ihrem chromatographischen Verhalten zeigen.

Tabelle 1

R_F-Werte der Chlorophyll a-Fraktionen der Chlorella- und Anacystis-Extrakte auf Kieselgel- und fettimprägnierten Kieselgurschichten.

		Kieselgel	Kieselgur, impr.
Chlorella	Chl. aI	0,40	0,15 - 0,20
	Chl. aII		0,11 - 0,14
Anacystis	Chl. aI	0,45	0,16 - 0,20
	Chl. aII		0,10 - 0,15

Die Chlorophyll-Zonen der Dünnschichtchromatogramme wurden von der Glasplatte abgeschabt, mit Diäthyläther eluiert und im registrierenden Spektralphotometer vermessen.- Tabelle 2 gibt die Lage der Absorptionsbanden (nm) im Bereich des sichtbaren Lichtes wieder.

Tabelle 2

Lage der Absorptionsbanden (nm) zweier dünnschichtchromatographisch getrennter Chlorophyll a-Fraktionen (gemessen in Diäthyläther).

					Kieselgel			
Chlorella	Chl. aI	660	614	572	529	492	428,5	409
Anacystis	Chl. aI	660	613	572	529	493	428,5	409
					Kieselgur, impr.			
Chlorella	Chl. aI	660	614	573	528	493	428,2	409
	Chl.aII	660	614	575	530	493	429,0	410
Anacystis	Chl. aI	660	614	575	531	493	429,0	409
	Chl.aII	660	613	575	530	493	428,5	409

Die in Tabelle 2 angegebenen Daten sind durch Mittelwertsbildung entstanden. Die Chromatographie an imprägnierten Schichten scheint einen geringfügigen Einfluß auf die Lage einiger Nebenbanden innerhalb der spektralen Feinstruktur zu haben. Die Abweichungen von den angegebenen Mittelwerten betragen maximal ± 0,5 nm, liegen demnach innerhalb der Fehlergrenze der Meßmethode.

Eine genauere Analyse der Absorptionsspektren ist durch Vergleich der Relationen der Extinktionswerte bei verschiedenen Wellenlängen möglich (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3

Relationen der Extinktionswerte der beiden Chlorophyll a-Fraktionen bei verschiedenen Wellenlängen.

λ_1/λ_2	Chlorella		Anacystis	
	Chl.aI	Chl.aII	Chl.aI	Chl.aII
660/614	5,29	5,22	6,26	5,85
660/574	8,55	8,30	10,08	10,00
428/660	1,34	1,335	1,28	1,31
428/409	1,55	1,53	1,52	1,48
428/379	2,40	2,40	2,41	2,30

Der Tabelle 3 sind Unterschiede zu entnehmen. Die auf 660 nm bezogenen Werte liegen für das Cyanophyceen-Chlorophyll etwas höher, und insgesamt liegen die Werte für die Chlorophyll-Begleitbanden (Chl.aII) geringfügig niedriger als die der Hauptkomponenten (Chl.aI). Die angegebenen Relationen sind jedoch wesentlich größeren Schwankungen unterworfen als die Lage der Absorptionsmaxima. Sie sind konzentrationsabhängig, und gerade die Feinstruktur der Spektren ist gegenüber Licht- und Luftsauerstoffeinwirkung sehr empfindlich. Die Differenzen können möglicherweise dadurch erklärt werden, daß die Arbeitsbedingungen bei der Dünnschicht-

chromatographie und die Aufnahme der Absorptionsspektren nicht ausreichend standardisiert werden konnten.

Die Ergebnisse lassen also nicht darauf schließen, daß das Chlorophyll der Cyanophyceen vom Chlorophyll a der Chlorophyceen verschieden ist. Auch geben sie keinen eindeutigen Beweis für die Verschiedenheit der beiden Chlorophyll-Fraktionen.

IR-spektroskopische Untersuchungen der aus Dünnschichten gewonnenen Präparate erwiesen sich als nicht durchführbar, da die eluierten Substanzen durch den Kontakt mit dem Schichtmaterial, dem Imprägnierungsmittel und dem Laufmittel stark verunreinigt waren. Technische Verbesserungen zur Nachreinigung chromatographisch getrennter Fraktionen wurden erst nach Abschluß dieser Untersuchungen entwickelt (s.u.).

ß) Ergebnisse der Craig-Verteilungen.

Im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie erwies sich die Gegenstromverteilung dazu geeignet, Pigmentfraktionierungen unter weitgehend standardisierten Versuchsbedinungen durchzuführen; vor allem war die Möglichkeit gegeben, den Trennvorgang in inerter Atmosphäre und unter Lichtausschluß ablaufen zu lassen. Auch die Temperatur konnte während eines Versuches annähernd konstant gehalten werden, die Reproduzierbarkeit der Experimente wurde jedoch durch die jahreszeitlichen Temperaturschwankungen innerhalb des Laboratoriums beeinflußt. Da der Verteilungskoeffizient stark temperaturabhängig ist, können demzufolge die für ihn ermittelten Werte nur Relativwerte darstellen.

Allen durchgeführten Versuchen war zu entnehmen, daß die Konzentrationskurve der Chlorophyllverteilung nicht symmetrisch ist und mit einer theoretischen Verteilungskurve nicht zur Deckung gebracht werden kann (vgl. Abb. 4).

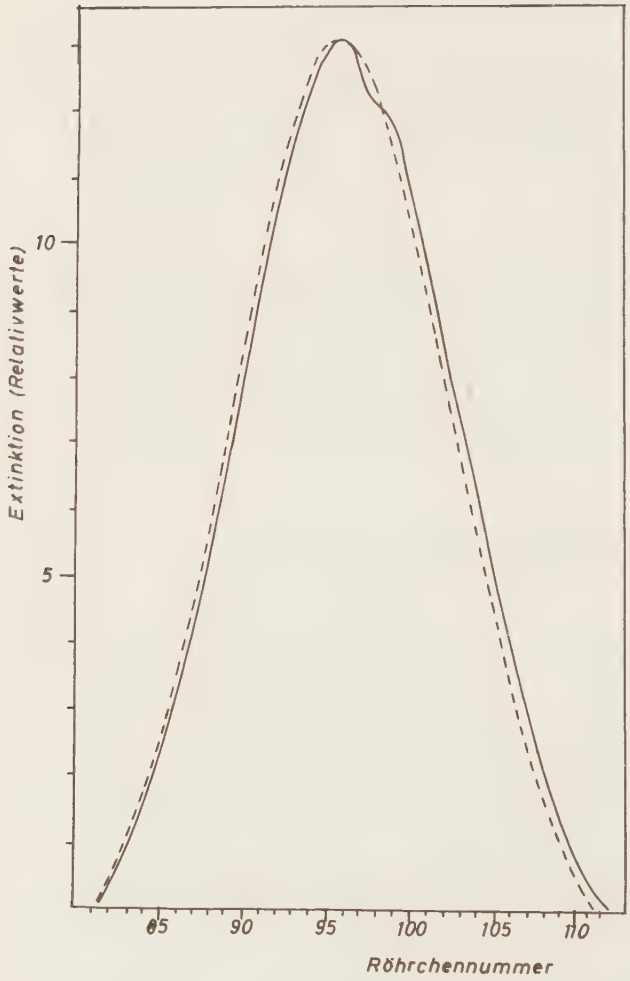


Abb. 4: Experimentelle (——) und theoretische (----) Verteilungskurven der durch Craig-Verteilung gewonnenen Chlorophyll a-Gesamtfraktion aus Anacystis nidulans.

Dem Maximum der experimentellen Kurven war in Richtung zunehmender Röhrchennummer eine Schulter vorgelagert. Der Abstand zwischen dem Hauptmaximum I und dem Nebenmaximum II beträgt bei verschieden großer Anzahl an Übertragungen (n 100) zwei bis drei Verteilungselemente (r), die Differenzen der für die Maxima I und II nach Gl. 2 berechneten Verteilungszahlen, GI und GII, liegen zwischen 0,09 und 0,1 (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4

Charakteristische Daten der Verteilung zweier Chlorophyll a-Fraktionen von Anacystis nidulans im Zwei-Phasen-System: 95%iger Methanol/Petroläther.

Versuchs-Nr.	t(°C)	r_I	r_{II}	G_I	G_{II}	r	ΔG(%)	β
1	15-18	69	71	1,29	1,38	2	7,0	1,07
2	20-22	101	104	1,46	1,56	3	6,7	2,28
3	15-18	96	99	1,32	1,32	3	7,0	1,63

Die Unsymmetrie der Kurven wird ebenfalls deutlich an Hand der unterschiedlichen Halbbandbreiten (vgl. Tabelle 5).

Um weitere Aufschlüsse über die anscheinend nicht einheitliche Chlorophyll-Fraktion zu gewinnen, wurden nun die Ober- und Unterphasen getrennt ausgewertet. Sofort nach Beendigung des Oberphasentransportes wurde den 12 Röhrchen, die die sichtbar stärkste Pigmentkonzentration enthielten, Proben entnommen und im Dunkel bei +5°C aufbewahrt, bis sie vermessen wurden. Sechs sowie 24 Stunden nach Beendigung des Trennvorganges wurden denselben Röhrchen erneut Proben entnommen.

Tabelle 5

Den Verteilungskurven der Chlorophyll-Fraktion entnommene halbe Bandbreiten (cm) beiderseits des Maximum I.

Versuchs-Nr.	$r \leq r_I$	$r \geq r_I$
1	3,2	3,6
2	3,6	4,2
3	3,0	3,5

Die sofort bzw. nach sechs Stunden durchgeführten Meßreihen ergaben übereinstimmende Ergebnisse und konnten zusammengefaßt dargestellt werden. Ihnen entsprechen in Abbildung 5 die Konzentrationskurven der Unter- und Oberphasen, $U_{1,2}$ und $O_{1,2}$, sowie die durch Addition erhaltene Kurve der Gesamtfraktionen $S_{1,2}$; analog wurden die aus der dritten Meßreihe resultierenden Kurven mit U_3, O_3 und S_3 bezeichnet.- Die gleiche Unsymmetrie, wie sie sich bei den vorangegangenen Versuchen ergab, ist auch hier evident. Da die Maxima nicht eindeutig zu bestimmen sind, sondern sich wiederum eine Aufspaltung in Haupt- und Nebenmaximum zeigt, ist die Zuordnung der theoretischen Verteilungskurven nicht möglich.

Die Meßreihen 1 und 2 für die Ober- und Unterphasen sowie für die Gesamtverteilung verlaufen gleichsinnig. Sie zeigen einen etwas zu flachen Anstieg bis zum Maximum I (r_I = 101), lassen zwischen r_I und r104 eine Schulter erkennen (Maximum II: rII= 103) und gehen in einen steileren Abstieg über. Ein auffallender Unterschied der Kurven 3 gegenüber den Kurven 1 und 2 besteht in der Verlagerung des Hauptmaximums I auf rI = 102 und der Ausbildung einer Schulter unterhalb des Maximums der Kurven 1 und 2 bei rII = r100.

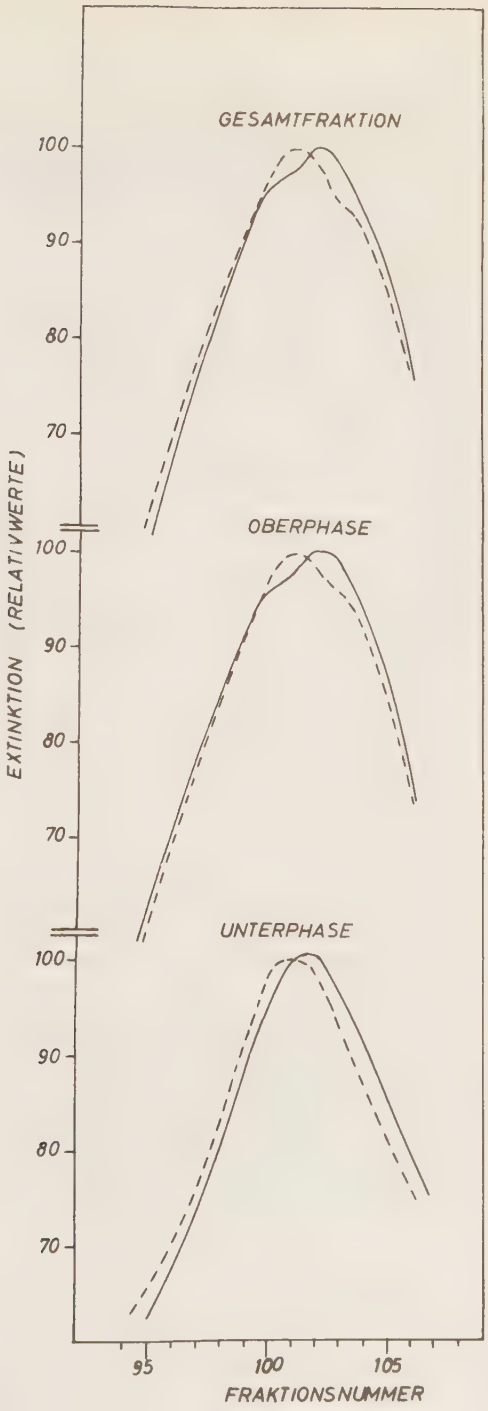


Abb. 5: Verteilungskurven der Chlorophyll-a-Fraktionen.
—— Meßreihen 1 u. 2 ($U_{1,2}$, $O_{1,2}$, S_{12}).
– – – Meßreihen 3 (U_3, O_3, S_3).

Um geringe Verdunstungsverluste der Oberphasen während 24 Stunden auszugleichen, wurden die Kurven der Verteilungen in den Oberphasen und Unterphasen und die Verteilungskurve der Gesamtkonzentrationen normiert. Dazu wurde das jeweilige Kurvenmaximum gleich 100 gesetzt.-Da aber anzunehmen ist, daß die Verluste an flüchtiger Oberphase in allen Verteilungselementen gleich groß war, kann die Verschiebung des Hauptmaximums 24 Stunden nach Beendigung des Trennvorganges nur durch eine Konzentrationsabnahme des Farbstoffes in den Elementen r<rI gedeutet werden. Nach 24 Stunden ist das ursprüngliche Hauptmaximum der Kurven 1 und 2 nur noch durch eine Schulter angedeutet, während das neue Maximum sich der Lage der in den Kurven 1 und 2 gefundenen Schulter angleicht. Demzufolge liegen in der Gesamtfraktion des Chlorophylls zwei Komponenten unterschiedlicher Löslichkeit und Stabilität vor.

In Tabelle 6 sind die nach Gleichung 2 berechneten Verteilungszahlen GI der Hauptmaxima und GII der Nebenmaxima der in Abbildung 5 dargestellten Verteilungskurven aufgeführt.

Tabelle 6

Nach Gl. 2 berechnete Verteilungszahlen GI und GII für die Maxima I und II verschiedener Chlorophyll-Verteilungskurven.

Verteilungskurve	GI	GII	ΔG(%)
(1,2)	1,46	1,56	6,9
(3)	1,43	1,50	4,7

Die Abweichungen der Verteilungszahlen GI und GII innerhalb einer Meßreihe liegen außerhalb der von HECKER (1955) angegebenen Fehlergrenze von ± 3%.

Unabhängig von Gleichung 2 können die Verteilungskoeffizienten auch aus den Konzentrationen benachbarter Fraktionen nach Gleichung 4 berechnet werden, vgl.Tab. 7.

Tabelle 7

Prozentuale Abweichungen der aus den Konzentrationen benachbarter Verteilungselemente berechneten Verteilungszahlen der Kurven $O_{1,2}$, $S_{1,2}$, O_3 und S_3 von den nach Gl. 2 ermittelten Werten (Bezugswerte).

Kurve	Fraktion	Bezugswert	G(%)
$O_{1,2}$	$r \leqslant rI$	GI	3,5
	$r \leqslant rI$	GII	6,8
	$r \geqslant rI$	GII	7,0
	$r \geqslant rI$	GI	10,0
$S_{1,2}$	$r \leqslant rI$	GI	1,4
	$r \leqslant rI$	GII	4,5
	$r \geqslant rI$	GII	10,0
	$r \geqslant rI$	GI	16,0
O_3	$r \leqslant rI$	GII	2,8
	$r \leqslant rI$	GI	7,4
	$r \geqslant rI$	GI	13,3
	$r \geqslant rI$	GII	19,0
S_3	$r \leqslant rI$	GII	2,8
	$r \leqslant rI$	GI	2,7
	$r \geqslant rI$	GI	8,7
	$r \geqslant rI$	GII	14,0

Die Abweichungen der Werte für den Kurvenanstieg bis zum 1. Maximum ($r \leqslant rI$) sind, auf dieses bezogen, am geringsten. Die nach HECKER zulässige Abweichung beträgt $\pm$ 3%. Demnach liegen diese Werte innerhalb der Fehlergrenzen. Werden dieselben Werte jedoch auf das entferntere Maximum bezogen, so liegen die prozentualen Abweichungen weit außerhalb der Fehlergrenzen. Mit zunehmender Röhrchennummer werden die Abweichungen von den Verteilungskoeffizienten der

Maxima größer.- Die nach Gleichung 2 berechneten Verteilungszahlen lassen sich also nicht bestätigen. Nach HECKER ist hieraus zu schließen, daß nicht die Verteilung einer einheitlichen Substanz vorliegt.

Von den bisherigen Ausführungen sei zusammenfassend festgehalten, daß der Vergleich der experimentell erhaltenen Verteilungskurven mit den berechneten theoretischen zwei auffällige Abweichungen zeigt: Erstens ist die experimentelle Kurve gegenüber der theoretischen verschoben, zweitens besitzt die Kurve eine dem Konzentrationsmaximum vorauseilende Schulter; die Lage des Maximums und der Schulter sind zudem abhängig von dem Zeitraum, der nach Beendigung des Trennvorganges bis zur Probenentnahme verstreicht.

Wie gezeigt wurde, beruhen diese Effekte auf einer Inkonstanz der Verteilungskoeffizienten über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg. Dies wird durch den Verlauf der Verteilungsisotherme bestätigt (vgl. Abbildung 6). Für höhere Pigmentkonzentrationen in Ober- und Unterphase weicht die Isotherme signifikant von einer Geraden ab. Das könnte darauf beruhen, daß die Konzentrationen in den zentralen Elementen bereits außerhalb des Gültigkeitsbereiches des Nernstschen Verteilungssatzes liegen.

Die kurvenmäßige Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten zeigt aber noch eine weitere Besonderheit: Die Werte für $r \leqslant r_{max}$ sind von den Werten für $r \geqslant r_{max}$ in gleichen Abständen vom Maximum verschieden. Auch bei einer konzentrationsabhängigen Verteilungsisotherme müßten sich aber die Werte beiderseits des Maximums entsprechen. Da dies nicht der Fall ist, muß auch hieraus geschlossen werden, daß die Chlorophyll-Fraktion der Cyanophyceen nicht einheitlich ist.

Um zu überprüfen, ob sich das Chlorophyll der Cyanophyceen im Gegenstromverfahren ebenso verhält wie das Chlorophyll a der Chlorophyceen, wurden gleiche Anteile eines Chlorella- und eines Anacystis-Extraktes einem gemeinsamen Trennprozeß

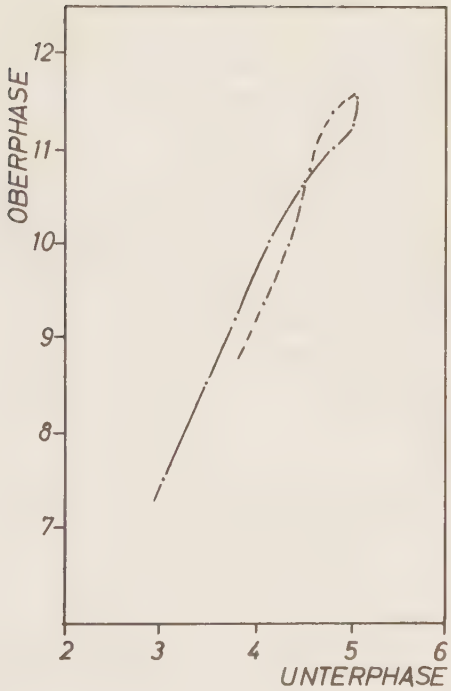


Abb. 6: Verteilungsisotherme einer durch Gegenstromverteilung gewonnenen Chlorophyll-Fraktion aus Anacystis nidulans.

unterworfen. Hierdurch waren absolut gleiche Versuchsbedingungen für beiderlei Extrakte gewährleistet. Die resultierenden Verteilungskurven ergaben die gleiche Kurvencharakteristik, wie sie bei den Verteilungen reinen Cyanophyceen-Chlorophylls erhalten wurden. Dem Hauptmaximum war wiederum in Richtung zunehmender Verteilungszahlen eine Schulter vorgelagert. Die Wiederholungsmessung 10 Stunden nach Beendigung des Trennvorganges zeigt die Ausbildung eines Plateaus im Bereich des Maximums. Hierdurch wurde ebenfalls die Tendenz der Verlagerung des Hauptmaximums im zeitlichen Verlauf deutlich. Auch dieser Versuch zeigte, daß die Konzentration der Komponente mit niedrigerer Verteilungszahl in Abhängigkeit von der Zeit (Versuchsende bis Probenentnahme) abnimmt.

Hätten in den beiden Extrakten zwei verschiedene Chlorophylle vorgelegen, so wäre eine abweichende Verteilungskurve zu erwarten gewesen. Das Chlorophyll a der Chlorophyceen zeigt also bei der Gegenstromverteilung gleiches Verhalten wie das der Cyanophyceen und muß daher als mit diesem identisch betrachtet werden.

Neben den Kriterien, die durch die Analyse der Verteilungskurven gewonnen werden konnten, sollten einige physikalische Daten der Chlorophyll-Fraktion untersucht werden. Für die Aufnahme der Absorptionsspektren im sichtbaren Wellenlängenbereich wurden die Pigmente der Unterphase durch Zugabe von Wasser in die Oberphase überführt. Die Bildung von Artefakten durch Einengen zur Trockne konnte hierbei vermieden werden. Entnommen wurden Proben aus dem Bereich des Konzentrationsmaximums, sowie in gleichen Abständen rechts und links vom Maximum, und zwar sofort nach Beendigung des Trennvorganges.

Die Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich sind für gleiche Konzentrationen deckungsgleich. Sie zeigen weder in der Lage der Absorptionsbanden noch in der Höhe der Extinktionen Unterschiede.- Um einen zuverlässigen Vergleich mit Literaturspektren zu erhalten, wurden die Proben eingeengt, in Diäthyläther aufgenommen und vermessen. Auch hier sind die aus verschiedenen Fraktionen gewonnenen Spektren identisch (vgl. Abb. 7). Folgende Absorptionsbanden wurden ermittelt: 659, 614, 576, 528, 490, 427, 410,5, 380,8 (nm). Das Verhältnis der Extinktionen der beiden Hauptmaxima ist: 427/659 = 1,32.

Ebenso stimmten die IR-Spektren in der Lage der Banden der dem Bereiche maximaler Konzentration entnommenen Proben mit denen der beiden Flanken überein. Geringe Abweichungen in den relativen Bandenhöhen waren nicht reproduzierbar, sie lagen innerhalb des stets zu beobachtenden Streubereiches (vgl. Abbildung 8).

Die Spektren im sichtbaren und infraroten Wellenlängenbereich sind eindeutig als Chlorophyll a-Spektren zu identifizieren.

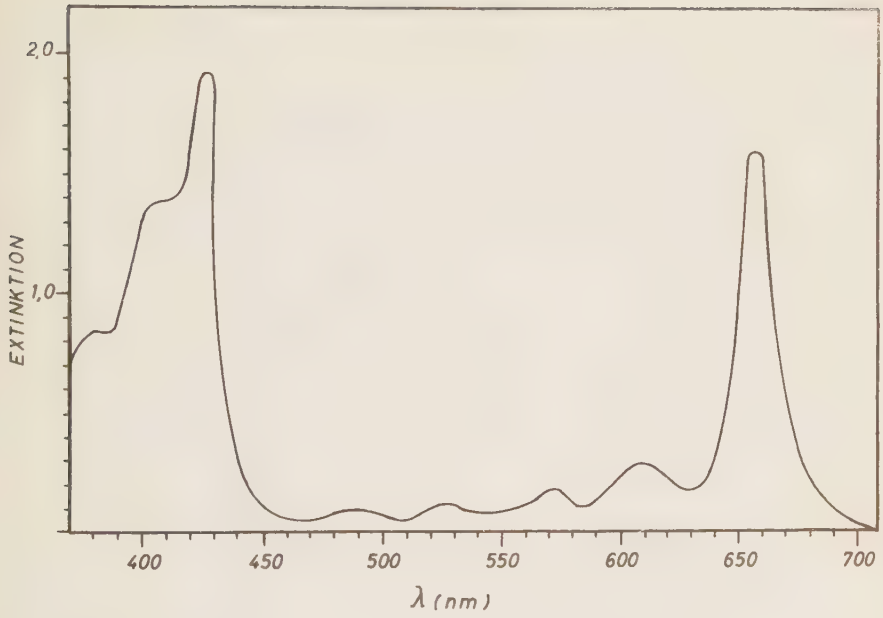


Abb. 7: Chlorophyll a - Absorptionsspektrum in Diäthyläther, gewonnen durch Gegenstromverteilung eines Extraktes aus Anacystis nidulans.

Die optischen und magneto-optischen Rotationsdispersionsspektren[x] von Proben rechts und links des Verteilungsmaximums brachten keine eindeutigen Ergebnisse. Die Registrierung an frischen Proben zeigt im Bereich der Soret-Bande geringe Unterschiede, bei Wiederholungsmessungen an "gealterten" Proben konnte die Verschiedenheit der Spektren nicht bestätigt werden.

x) Die Aufnahmen wurden im Gastlabor der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) durchgeführt. Herrn Dr. Klink bin ich für die Hilfe bei den Messungen zu Dank verpflichtet.

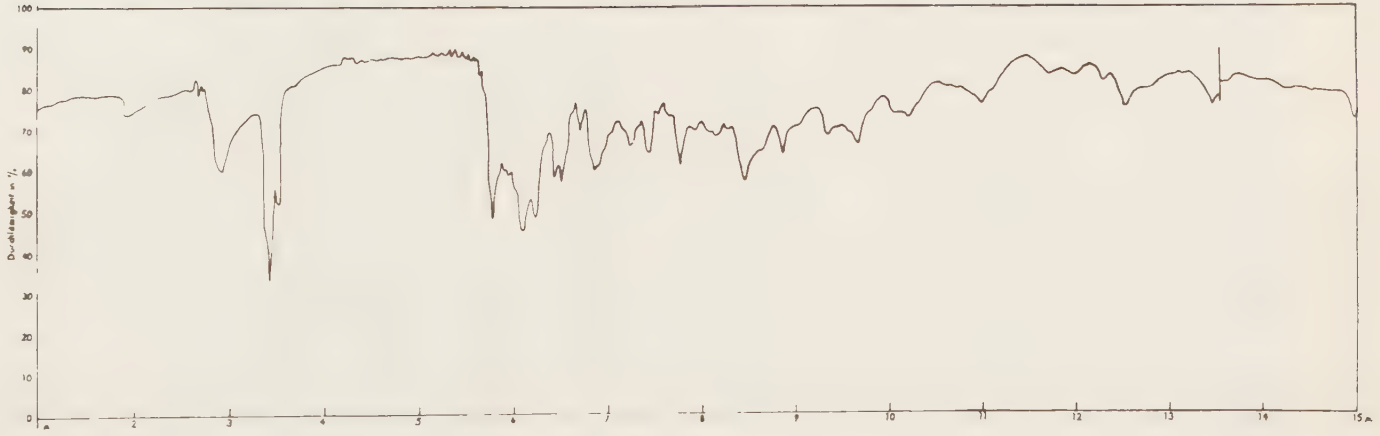


Abb. 8: IR-Spektrum von Chlorophyll a, gewonnen durch Gegenstromverteilung aus Anacystis nidulans. (KBr)

c. Charakterisierung des "P 750"

An Hand von Remissions- und Transmissionsspektren der mit verschiedenen Lösungsmitteln behandelten Zellrückstände wurde nachgewiesen, daß Extraktionen mit Methanol, Aceton, Petroläther, Diäthyläther, Tetrahydrofuran, Benzol, Pyridin oder Dimethylformamid keinen Einfluß auf Herauslösung des "P 750" aus den Anacystis-Zellen haben. Das Verhältnis der Absorptionen des Phycocyanins zu der des "P 750" (4 : 1) blieb erhalten. Dagegen wurden durch Behandlung mit 3%iger Essigsäure und 0,1 n HCl sowohl Phycocyanin als auch das "P 750" extrahiert. Dimethylsulfoxyd und Propylenoxyd jedoch lösten nur das "P 750" und beließen den blauen Farbstoff in den Zellrückständen. Somit erwies sich das "P 750" als hydrophile Verbindung, die in der Zelle fester gebunden vorkommt als Chlorophyll und Carotinoide.

Wie bereits erwähnt, wurde daraufhin Propylenoxyd als Extraktionsmittel der mit Aceton vorbehandelten Zellen verwendet, vgl. Abb. 9. In diesem Extrakt lag schon eine Anreicherung des "P 750" vor. Abgeschätzt nach der Größe der Absorptionswerte betrug das Verhältnis Chlorophyll :"P 750" = 5 : 1. Durch Ausschütteln mit Petroläther/Aceton, Diäthyläther und n-Hexan konnte der Farbstoff weitgehend von seinen Begleitpigmenten abgetrennt werden.

Die anschließende Dünnschichtchromatographie ergab, daß noch vier bis fünf Begleitsubstanzen - allerdings in nur durch UV-Licht nachzuweisenden Konzentrationen - vorhanden waren (vgl. Abbildung 10). Die sichtbar gelb-braun gefärbte Pigmentzone konnte von diesen Verunreinigungen leicht getrennt werden. Ihr R_F-Wert betrug 0,4-0,42. Das methanolische Eluat der Schicht nahm mit zunehmender Farbstoffkonzentration oliv-grüne Färbung an. Bei Bestrahlung der Dünnschichtchromatogramme mit UV-Licht (λ = 366 nm) zeigt die "P 750"-Zone charakteristische Fluoreszenzlöschung.

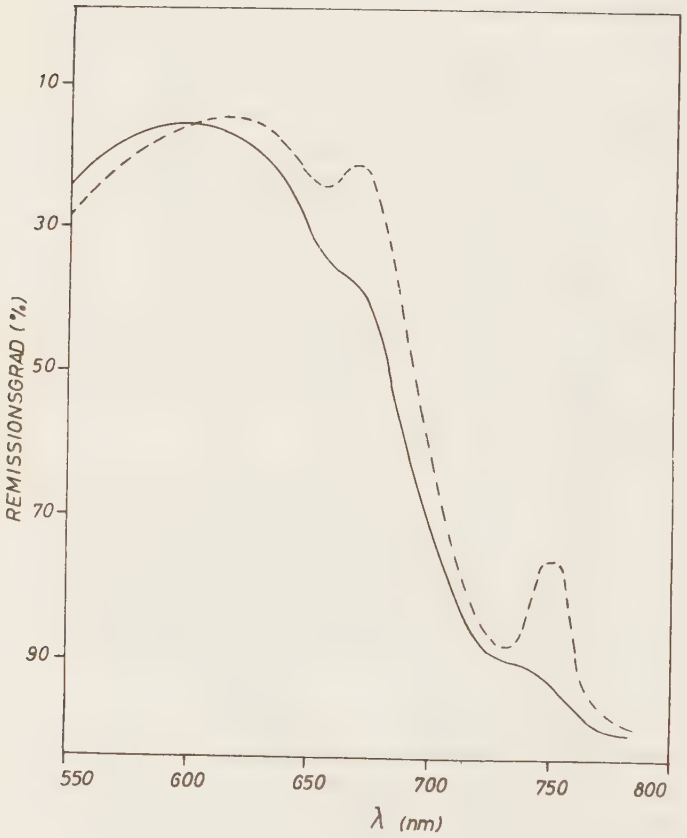


Abb. 9: Remissionsspektren der Zellrückstände von Anacystis nidulans: (– – –) nach Behandlung mit Aceton, (———) nach anschließender Extraktion mit Propylenoxyd.

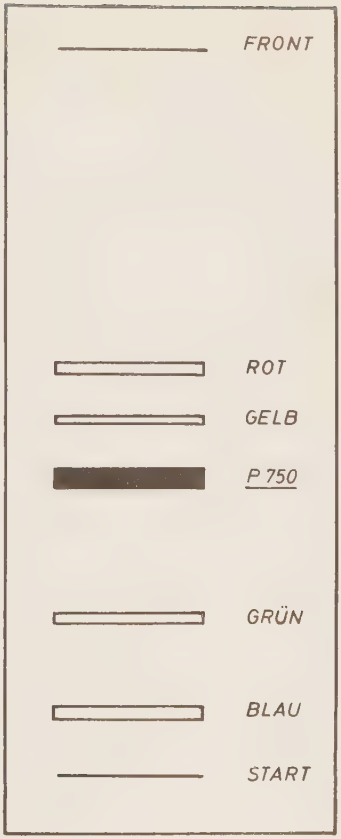


Abb. 10: Dünnschichtchromatogramm eines "P 750"-haltigen Extraktes aus Anacystis nidulans.
Nebenstehend die bei Anregung mit λ =366 nm resultierende Fluoreszenzfarbe der Begleitsubstanzen.

Das Dünnschichteluat konnte direkt zur Aufnahme des Absorptionsspektrums verwendet werden (vgl. Abb. 11). Die Hauptmaxima liegen bei 350 und 382 nm im UV und bei 731 nm im fernen Rot-Bereich. Eine Feinstruktur zwischen den Hauptmaxima wird durch Absorptionen bei 470, 508 und 675 nm hervorgerufen.

Das Spektrum ähnelt dem Absorptionsspektrum des Bakteriophäophytins in gewisser Weise, die genaue Lage der Extinktionsmaxima stimmt jedoch nicht überein(s.Diskussion).

Für die Aufnahme von IR-Spektren mußten die Dünnschichtpräparate nach dem oben beschriebenen Verfahren nachgereinigt werden. Vor allem das als Laufmittel verwendete schwerflüchtige o-Dichlorbenzol konnte bei diesem Prozeß eliminiert werden. IR-Spektren wurden registriert von der Probe und von einem Eluat aus pigmentfreiem Dünnschichtmaterial, das die gleichen Nachreinigungsverfahren durchlief wie das Eluat der Probe. Das Vergleichsspektrum zeigt zwar noch Absorptionen im IR, konnte aber jetzt in die Berechnung eines Differenzspektrums einbezogen werden (vgl. Abbildung 12 und Tabelle 8).

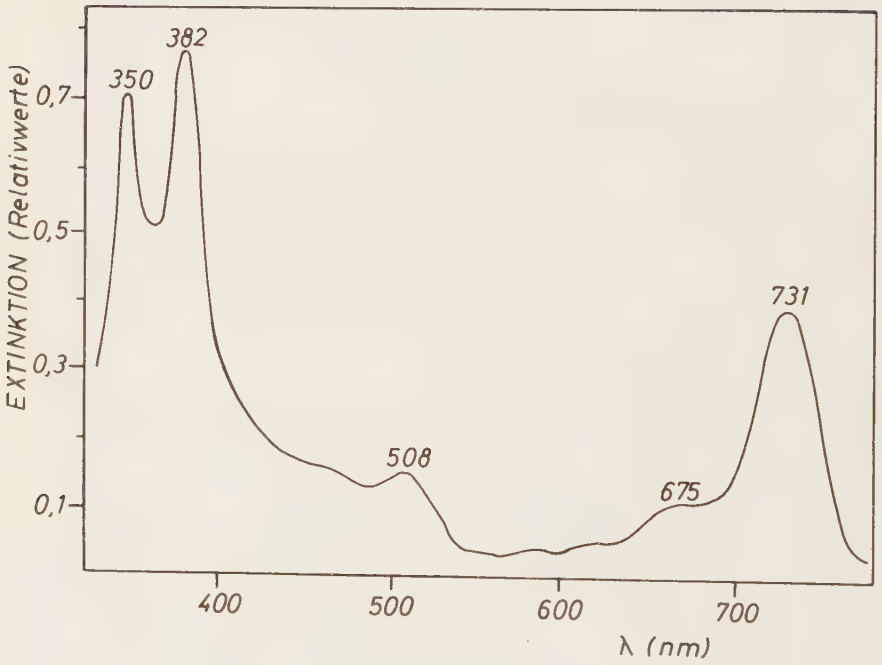
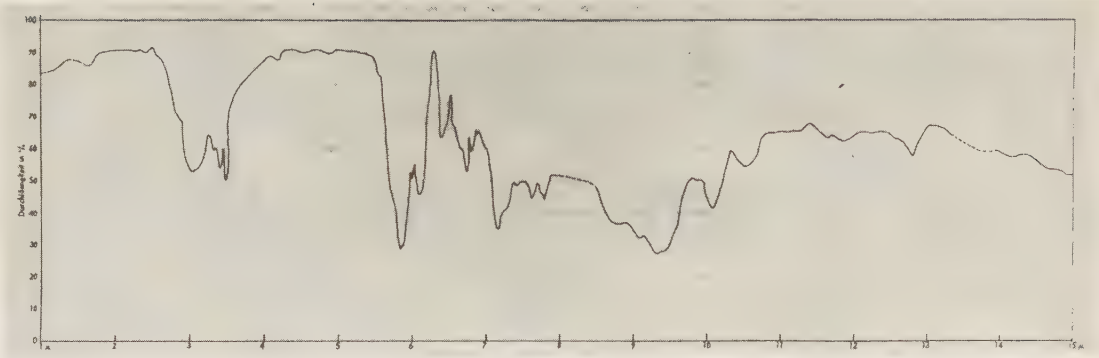


Abb. 11: Absorptionsspektrum des gereinigten "P 750" aus Anacystis nidulans in Methanol.



Tab. 12: [illegible]ektrum des "P 750" aus Anacystis nidulans
[illegible]

Tabelle 8

Lage der Absorptionsbanden im IR-Spektrum des aus Anacystis nidulans isolierten "P 750".

µ	cm^{-1}
2,83	3554
3,0	3333
3,1	3226
3,3	3030
3,39	2950
3,47	2882
5,74	1742
5,82	1718
5,99	1669
6,1	1639
6,42	1558
6,67	1499
6,75	1481
6,81	1468
7,18	1393
7,26	1377
7,62	1312
7,80	1282
9,32	1073
9,45	1058
10,1	990
12,83	781

Das im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen aufgenommene ESR-Septrum des "P 750" gab keinerlei Hinweis auf das Vorkommen von Magnesium, Kupfer oder Eisen (III). Gleiche negative Ergebnisse lieferten die Auswertung der Atomabsorption (aufgenommen im Gastlabor der Firma Perkin-Elmer, Überlingen) sowie die Massenspektren (s.u.). Die mit Natriumborohydrid reduzierte Probe ließ im ESR-Spektrum das Vorkommen von organischen Radikalen erkennen.

Ein Teil der gereinigten Proben des "P 750" konnte zur Aufnahme des Massenspektrums verwendet werden.[x)] Registriert wurde die Massenzahl 576 (±) 1. Ferner traten Molekülbruchstücke mit folgenden Massenzahlen auf: 548, 423, 367, 313, 239, 185, 129 und 98. Das Spektrum spricht außerdem für das Vorhandensein mehrerer (7-9) gesättigter Kohlenwasserstoffgruppierungen, über deren Anordnung jedoch noch keinerlei Aussagen gemacht werden können.

x) Herrn Dr. W. Benz (BASF, Ludwigshafen) danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Diskussion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, daß in den Zellen der Cyanophycee Anacystis nidulans neben Carotinoiden und Phycocyanin zwei nahe verwandte Formen des Chlorophyll a sowie ein weiteres Pigment mit sehr langwelliger Absorption vorliegen. Diese Feststellungen gründen sich zunächst auf die in vivo-Spektroskopie von Algensuspensionen.- Über die Schwierigkeiten, die starke Streuung von aufgeschwemmten Zellen zu eliminieren oder wenigstens rechnerisch zu berücksichtigen, ist schon viel diskutiert worden (vgl. z. B. AMESZ, DUYSENS und und BRANDT 1961, SHIBATA, BENSON und CALVIN 1954). Die von METZNER (1963) angewandte Methode zur Aufnahme von Remissionsspektren gefriergetrockneter Chlorella-Zellen läßt sich nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in Durchflußküvetten übertragen. Zwar erhält man auch hier Daten, die sich mittels der Kubelka-Munk-Funktion in Extinktionswerte umrechnen ließen (METZNER 1966 a,b), doch muß hier bereits mit nicht zu vernachlässigenden Fehlern gerechnet werden: Einerseits stört die Spiegelreflexion an der Küvettenfrontscheibe,zum anderen tritt innerhalb des Meßraumes selbst eine seitliche Streuung auf, wodurch zusätzliche Lichtverluste entstehen. Zwar verschieben diese Störfaktoren nicht die Lage der Absorptionsmaxima; sie verfälschen aber deren Amplituden. Zudem sind Reflexionsmessungen stark konzentrationsabhängig; bei hohen Zelldichten erscheinen die Spektren "gestaucht" (vgl. DUYSENS 1956). Aus diesem Grunde beschränkten sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten spektroskopischen Messungen auch zunächst allein auf eine Festlegung der Bandenlage.

Die Anacystis-Suspensionen lieferten Absorptionsbereiche bei 430-440 und 670-680 nm, die beide auf das Chlorophyll a zurückgehen, darüber hinaus eine breitere Bande mit einem Schwerpunkt bei 490 nm, welche von den Carotinoiden, und eine Bande bei 620-630 nm, welche vom Phycocyanin herrührt. Im

ferneren Rotbereich traten zwischen 750 und 760 nm weitere, wenn auch wesentlich schwächere, Absorptionsbanden auf. Wie für Chlorella (METZNER 1963), so ergab sich auch für Anacystis nidulans eine Feinstruktur der langwelligen Absorptionsbande des Chlorophyll a. Die Maxima bzw. Schultern wurden bei 673,5, 677, 679 und 681,5 nm gefunden. Diese Aufspaltung scheint reell zu sein; sie wurde nicht nur bei einzelligen Algen (vgl. THOMAS 1963) sondern auch bei ganzen Laubblättern (ALBERS und KNORR 1937, BROWN und FRENCH 1959) und bei isolierten Chloroplasten THOMAS, KLEINEN HAMMANS und ARNOLDS 1965) gefunden.

Erst während der Durchführung der hier vorgelegten Messungen wurde von HAGEMEISTER ein neuer Küvettentyp entwickelt (s. Methodik). Für diese Meßzelle ließen sich Gleichungssysteme angeben, mit deren Hilfe es gelingt, Extinktions- und Streuwerte voneinander zu trennen. Wie Tab.1(vgl.S.25) erkennen läßt, entsprechen die in der Durchflußküvette alten Typs gemessenen "Absorptionswerte" in der Lage ihrer Maxima im wesentlichen den Maxima der Streukurve; die Maxima der wahren Extinktionskurven dürften demnach etwas niedriger liegen. Im langwelligen Spektralgebiet wären zwei weitere Maxima anzunehmen: bei 730 und 740 nm. Da aber die von HAGEMEISTER angegebene Meßmethode, insbesondere die Art der Auswertung, bisher nur für Chlorella-Zellen exakt überprüft wurde - die Anacystis-Zellen sind wesentlich kleiner - sollen diese Abweichungen gegenüber den eigenen Messungen und gegenüber den Daten anderer Autoren hier nicht weiter diskutiert werden.

Unabhängig davon, ob die von HAGEMEISTER angegebenen Korrekturen für Anacystis gelten oder nicht, darf als sicher gelten, daß die Chlorophyll a-Bande wenigstens zweigipfelig ist und daß im Bereich des längstwelligen Rot noch mindestens eine weitere Bande vorliegt. Die der letztgenannten Lichtabsorption zugrundeliegende Verbindung soll hier weiterhin als "P 750" (vgl. GASSNER 1962) bezeichnet werden.

Nicht nur durch absorptionsspektroskopische Messungen sondern auch durch die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie wird die Mehrgipfeligkeit des Chlorophyll a-Bandes nahegelegt. Insbesondere bei tiefen Temperaturen ließen sich zwei Emissionsbanden ausmachen (GOEDHEER 1964). Die Ursache dieser Mehrgipfeligkeit ist dagegen sehr umstritten. Etliche Farbstoffe zeigen eine Aufspaltung ihrer Absorptionsbande, wenn sie an einen Träger absorbiert werden (vgl. MEIER 1963). Die Zusatzbanden können dabei beiderseits des Hauptabsorptionsgipfels liegen. Untersuchungen von THOMAS und Mitarbeitern (1965) zufolge kann diese Interpretation für die Chlorophyll-Absorptionsbanden jedoch nicht zutreffen. Andere Autoren nehmen an, daß das Chlorophyll in der Zelle an verschiedene Träger angeheftet sein kann (WASSINK, KATZ und DORRESTEIN 1939), wodurch sich Komplexe unterschiedlichen Absorptionsverhaltens ergeben könnten. Es ist auch oft diskutiert worden, daß im Chloroplasten nicht nur monomeres Chlorophyll vorliegt sondern daß der Farbstoff zu Aggregaten verschiedener Größe zusammentreten kann, die dann längerwellige Banden aufweisen sollen (BRODY und BRODY 1963, 1966; KRASNOVSKII and KOSOBUTSKAYA 1953; KRASNOVSKII 1965).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aller anderen Autoren wurde auch in der vorliegenden Untersuchung festgestellt, daß die Absorptionsbande molekular gelösten Chlorophylls stets eingipflig ist. Selbst hochauflösende Instrumente lassen keine Andeutung einer Mehrgipfeligkeit erkennen. Die spektroskopischen Daten sprechen dafür, daß es sich bei dem Chlorophyll der Cyanophyceen um "echtes" Chlorophyll handelt; dies konnte sowohl durch den Vergleich der Elektronenspektren (PERKINS und ROBERTS 1964, WINTERMANS und DE MOTS 1965) als auch der IR-Spektren (STOLL und WIEDEMANN 1959, METZNER und STRUSS 1963, DOUGHERTY, KATZ und BOUCHER 1966) bewiesen werden.

Wenn die dünnschichtchromatographischen Trennungen auf fettimprägnierten Kieselgur-Schichten zwei Chlorophyll a-Banden ergaben, so braucht dies noch nicht für eine Heterogenitat des Pigments zu sprechen. Wir wissen aus zahlreichen Unter-

suchungen an empfindlichen Naturstoffen, daß es im Kontakt mit adsorptiv wirksamen Oberflächen leicht zu Veränderungen der Moleküle kommen kann (vgl. CHOVIN 1959). Dabei dürfte die Photooxydation eine besondere Rolle spielen (BACON 1966); dies gilt ganz besonders auch für die Carotinoide und Chlorophylle (STRAIN, SHERMA und GRANDOLFO 1967). Wahrscheinlich liegen ähnliche Veränderungen auch den älteren Befunden von STRAIN und MANNING (1942) zugrunde, die bei der Chlorophyllextraktion unter hohen Temperaturen zwei Chlorophyll a-Formen - von ihnen als Chlorophyll-Isomere a und a' bezeichnet - erhielten.

Die hier angewandte Gegenstromverteilung vermeidet diese Schwierigkeiten (vgl. METZNER, FISCHER und STRUSS 1967). Die Trennungen laufen in einer N_2-Atmosphäre und in völliger Dunkelheit ab. Wenn auch unter diesen Bedingungen keine symmetrische Verteilungskurve erhalten wurde und wenn überdies die Verteilungsisotherme charakteristische Besonderheiten zeigt, so kann dies nicht als methodischer Fehler interpretiert werden. Es muß daher angenommen werden, daß entweder das aus den Zellen extrahierte Chlorophyll a aus mehr als einer Komponente besteht oder aber daß das ursprünglich einheitliche Pigment im Kontakt mit den verwendeten Lösungsmitteln in eine andere - vermutlich stabilere - Form umgewandelt wird. Die optischen Rechnungen an den beiden Komponenten haben bisher - vielleicht mit Ausnahme der Bestimmungen der optischen Rotationsdispersion - keinerlei Anhaltspunkte für Verschiedenheiten ergeben. Indessen kann kein Zweifel daran bestehen, daß sich zwei Verbindungen mit unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten auch chemisch voneinander unterscheiden müssen. Vorläufig ist nur die Arbeitshypothese möglich, daß während der Trennung im Gegenstromverteiler zwei unterschiedlich stabile Chlorophyll-Formen vorgelegen haben. Die Labilität der Komponente mit niedrigerem Verteilungskoeffizienten besteht in erster Linie gegenüber Licht- und Luftsauerstoffeinwirkung (geöffnete und schwach belichtete Apparatur während der Ent-

nahme der Proben). Die unterschiedliche Stabilität mag auch erklären, warum keinerlei Anhaltspunkte über physikalische Verschiedenheiten der Verbindungen festgestellt werden konnten. Wahrscheinlich reichen die mit der Aufnahme der Spektren verbundenen Manipulationen aus, die labilere Komponente zu zerstören.- Das Chlorophyll mit dem größeren Verteilungskoeffizienten dürfte vermutlich auch in den spektroskopischen Untersuchungen anderer Autoren vorgelegen haben. Es soll daher als Chlorophyll a bezeichnet werden; die labilere Komponente möchte ich vorerst als Chlorophyll a_o bezeichnen. Sie dürfte vom Chlorophyll a' STRAINs und MANNINGs verschieden sein.

Diese Heterogenität des freien Chlorophylls hat nichts zu tun mit der möglichen Bindung dieses Pigments an mehr als einen Träger der Chloroplastenlamellen. Dagegen könnte sowohl die Anheftung an unterschiedliche Lipoproteide - wie sie von SIRONVAL (1965) isoliert werden konnten - als auch das Vorkommen verschiedener Chlorophylle die Beobachtungen von THOMAS und VAN DER WAL 1964 erklären, wonach die verschiedenen spektroskopisch nachweisbaren Chlorophyll-Formen in Aceton-Puffer-Gemischen unterschiedlich löslich sind.

Ob die beiden im Gegenstromverteiler erhaltenen Chlorophyll a-Formen mit in vivo vorkommenden Pigmentformen übereinstimmen, läßt sich vorerst nicht entscheiden. Offen bleibt auch, ob sie mit dem sog. Emerson-Effekt in Beziehung gebracht werden dürfen, den man heute durch die Annahme zweier hintereinandergeschalteter Lichtreaktionen deutet, die durch verschiedene Pigmente sensibilisiert werden. Die Beobachtungen über den Energietransport innerhalb der Chloroplasten führen zu der Vorstellung, daß beide Chlorophylle - und vermutlich auch die übrigen Begleitpigmente - die von ihnen absorbierte Quantenenergie auf ein im langwelligen Rot absorbierendes Pigment übertragen. Als solche "Endstation" der Energieleitung wird vielfach das von KOK (1961) beschriebene "P 750" betrachtet.

Bei den Cyanophyceen liegt neben diesem Pigment wenigstens eine Komponente vor, deren Absorptionsbande weiter in den langwelligen Bereich verschoben ist. Aus spektroskopischen Messungen wurde dies bereits mehrfach erschlossen (GOVINDJEE, CEDERSTRAND und RABINOWITCH 1961, GASSNER 1962). LIPPINCOTT, AGHION, PORCILE und BERTSCH (1962) fanden ähnliche langwellige Absorptionen auch in Chloroplasten-Bruchstücken, die sie einer kristallinen Form des Chlorophylls zuschrieben. Hierbei könnte es sich allerdings um Artefakte handeln, die erst bei der Präparation entstanden sind, zumal die erhaltenen Suspensionen keine Hill-Reaktion mehr erkennen ließen (vgl. NISHIZAKI 1964).

Ein aus Chenopodium-Blättern isolierter Chlorophyll-Komplex ließ sich durch Belichtung in eine Form mit einer Absorptionsbande bei 743 nm umwandeln (YAKUSHIJI 1963, TERPSTRA 1966). Bei Anacystis nidulans ist eine derartige Photoaktivität nicht bekannt. Dagegen scheint dieses Pigment mit einem Farbstoff identisch zu sein, den GASSNER (1962) aus der Cyanophycee Synechococcus cedrorum gewinnen konnte. Jedenfalls stimmen die beiden Verbindungen in ihren Elektronenspektren gut überein. Durch einen Vergleich mit dem Spektrum anderer Porphyrine schloß GASSNER seinerzeit darauf, daß es sich bei diesem Cyanophyceen-Pigment um eine dem Bacteriophäophytin ähnliche Verbindung handeln könnte. Auch in den vorliegenden Experimenten konnte ausgeschlossen werden, daß bei Anacystis Bacteriochlorophyll vorliegt. Es ist daher auch sehr unwahrscheinlich, daß das entsprechende Phäophytin auftritt. Außerdem läßt ein kritischer Vergleich doch erkennen, daß die Absorptionsbanden des Bacteriophäophytins von denen des "P 750" abweichen. Bacteriophäophytin hat in Äther folgende Absorptionsbanden: 750, (680, 616), 528, (494, 461, 387), 357 nm (KIM 1966). Die Zweigipfligkeit im blauen Spektralbereich zeigt hier eine wesentlich schwächere Ausprägung als beim "P 750". Außerdem liegt das langwellige Absorptionsmaximum des Bacteriophäophytins bei 750 nm, ist also um 20 nm zum Längerwelligen hin verschoben. Gegen die Ähnlichkeit des "P 750" mit dem Bacteriophäophytin

spricht ebenfalls deren unterschiedliche Löslichkeit: "P 750" ist nur zu einem sehr geringen Teil in Äther löslich.

Wesentlich aufschlußreichere Daten lieferte das IR-Spektrum. Beim Vergleich mit Spektren anderer cyclischer Tetrapyrrolpigmente ist zu ersehen, daß die für Porphyrine des Chlorin-Typs - wie etwa Chlorophyll a - charakteristische Bande bei 1610 cm^{-1} (WETHERELL, HENDRICKSON und McINTYRE 1959) fehlt. Andererseits lassen sich mancherlei Ähnlichkeiten mit offenkettigen Tetropyrrolpigmenten vom Typ der Gallenfarbstoffe ausmachen (vgl. Sadtler-Katalog: DINSMORE und EDMONDSON 1959).- Der Aufnahme des Massenspektrums zufolge, sollte es sich um eine Verbindung mit dem Molekulargewicht 576 (±)1 handeln. Auch dieser Wert spricht gegen ein neues Chlorophyll und mehr für ein metallfreies Tetrapyrrolpigment. Auch nach der Größe des Molekulargewichts und den Massenzahlen der wichtigsten Fragmentierungsprodukte ist nicht damit zu rechnen, daß ein Porphyrin vom Chlorin-Typ vorliegt (vgl. VON DER HAAR 1966); doch läßt sich vorerst - ebenso wie beim Phytochrom - noch nicht ausschließen, daß eine ringförmige Verbindung vorliegt. Jedenfalls ähnelt das IR-Spektrum des "P 750" in mancherlei Beziehung auch dem des Protoporphyrins (GNANICK 1960).

Von wesentlicher Bedeutung ist die Frage, ob das "P 750" in photobiologische Prozesse eingreift. In diesem Zusammenhang gewinnen eine Reihe älterer Arbeiten an Interesse, in denen physiologische Reaktionen verschiedener Cyanophyceen auf sehr langwellige Strahlung nachgewiesen werden konnten. So beschreibt DANGEARD (1927), daß einige Blaualgen noch im Spektralbereich um 740 nm wachsen - also sicherlich auch assimilieren-können. NULTSCH und RICHTER (1963) fanden bei 720 nm einen schwachen aber signifikanten Kohlenstoff-Einbau in Oscillatoria-Fäden. Diese Beobachtungen, die durch eine ganze Reihe weiterer Befunde ergänzt werden könnten, sprechen dafür, daß in der Cyanophyceen-Zelle Pigmente vorliegen, die

Reaktionen mit sehr energiearmen Lichtquanten zu sensibilisieren vermögen.

In dieser Beziehung stehen die Blaualgen aber keineswegs isoliert da. Einen Einfluß langwelliger Strahlung lassen auch Zellen höherer Pflanzen erkennen. GOVINDJEE, RABINOWITCH und THOMAS (1960) beschrieben einen Rückgang der Photosyntheserate bei Bestrahlung der Gewebe mit langwelligem Rotlicht von λ>720 nm. Auch hier muß demnach ein Sensibilisator vorhanden sein, der auf energiearme Photonen eingestellt ist. Wenn Strahlung vergleichbarer Wellenlängen bei Blaualgen nicht nur keine Photosynthesehemmung hervorruft, sondern den Einbau von Kohlenstoff begünstigt, so spricht dies allerdings dafür, daß die Thylacoidpigmente bei diesen Organismen andere Reaktionen steuern. Die weiteren Untersuchungen werden zu klären haben, ob das "P 750" Teil des Reaktionszentrums ist, auf das - möglicherweise über noch unbekannte Zwischenstufen hinweg - letztlich alle Energie konzentriert wird, die in den Chromatophorenpigmenten absorbiert wurde. Dabei bleibt sehr sorgfältig zu prüfen, ob bzw. inwieweit eine Verwandtschaft zwischen den "P 750" und dem Phytochrom (vgl. SIEGELMAN, TURNER und HENDRICKS 1966) bestehen könnte, das kürzlich auch für Rotalgen-Thalli nachgewiesen werden konnte (DRING 1967).

Zusammenfassung

Die in vivo-Spektroskopie an der einzelligen Blaualge Anacystis nidulans bestätigte das Vorkommen von wenigstens zwei Chlorophyll-Formen. Als langwelliges Begleitpigment wurde das "P 750" nachgewiesen.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte ergab eine Aufspaltung der Chlorophyll-Fraktion in zwei Banden. - Um mögliche Artefaktbildungen zu vermeiden, wurden die Extrakte ferner im Gegenstromverfahren nach Craig aufgetrennt. Die charakteristischen Besonderheiten der Verteilungskurven und der Verteilungsisotherme der Chlorophyll-Fraktion weisen darauf hin, daß während des Trennvorganges zwei-spektroskopisch nicht unterscheidbare - Chlorophyll-Formen unterschiedlicher Stabilität vorgelegen haben.

Die Absorptionsspektren im sichtbaren und im infraroten Wellenlängenbereich sowie das Verteilungsverhalten in Zwei-Phasen-Systemen weisen das Chlorophyll eindeutig als Chlorophyll a aus.

Es wurde eine Methode zur Isolierung und Reinigung des "P 750" angegeben. Dieser Farbstoff scheint identisch zu sein mit dem von GASSNER (1962) aus Synechococcus cedrorum gewonnenen Pigment gleicher langwelliger Absorption. Die Annahme GASSNERs, daß es sich hierbei um ein dem Bacteriophäophytin ähnliches Pigment handele, konnte widerlegt werden. Die aus Elektronen-, IR- und Massenspektren gewonnenen Daten sprechen für ein metallfreies Tetrapyrrolpigment vom Typ der Phycobiline, vergleichbar dem Chromophor des Phytochroms.

Literaturverzeichnis

ALBERS, V. M., and H. V. KNORR: Absorption spectra of single chloroplasts in living cells in the region from 664 - 704 mu. Plant. Physiol. 12, 833-843 (1937).

AMESZ, J., L. N. M. DUYSENS, and D. C. BRANDT: Methods for measuring and correcting the absorption spectrum of scattering suspensions. J. theoret. Biol. 1, 59-74 (1961).

BACON, M. F.: Artifacts from chromatography of chlorophylls. Biochem. J. 101, 34c (1966).

BRODY, M., and S. S. BRODY: The existence of chlorophyll aggregates of room temperature in vivo and in vitro. Biochim. Biophys. Acta 112, 54-57 (1966).

BRODY, S. S.,and M. BRODY: Photosynthesis mechanisms in green plants. Nat. Acad. Sci.-Nat. Res. Counc. Washington, Publ. nr. 1145, p. 455 (1963).

BROWN, J. S., and C. S. FRENCH: Absorption spectra of the different forms of chlorophyll in Chlorella. Plant. Physiol. 34, 305-309 (1959).

BÜNNING, E. und H. HERDTLE: Physiologische Untersuchungen an thermophilen Blaualgen. Z. Naturforsch. 1, 93-99 (1946).

CHOVIN, P.: in E. LEDERER (Edit.) "Chromatographie en Chemie Organique et Biologique" I, 1, Masson et Cie., Paris 1959.

DANGEARD, P. A.: Recherches sur l'assimilation chlorophyllienne et les questions qui s'y rattachent. Le Botaniste, Série XIX, pp. 204-205, 390-391 (1927).

DINSMORE, H. L., and P. R. EDMONDSON: Infrared microspectra of biochemical substances. II. Spectrochim. Acta 15, 1032-1035 (1959).

DRAWERT, H.: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. I. Mitteilung. Planta 37, 161-209 (1949).

DREWS, G.: Die phototaktischen Reaktionen einiger Cyanophyceen. Ber. dtsch. bot. Ges. 70, 259-262 (1957).

DREWS, G. und H. MEYER: Untersuchungen zum chemischen Aufbau der Zellwände von Anacystis nidulans und Chlorogloea fritschii. Arch. Mikrobiol. 48 (3), 259-267 (1964).

DREWS, G. und W. NIKLOWITZ: Beiträge zur Cytologie der Blaualgen. II. Arch. Mikrobiol. 24, 147-162 (1956).

DRING, M. J.:Phytochrom in red alga, Porphyra tenera. Nature 215, 1411-1412 (1967).

DUYSENS, L. N. M.: Transfer of excitation energy in photosynthesis. Thesis. Utrecht 1952.

DUYSENS, L. N. M.: The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. Biochim. Biophys. Acta 19, 1-12 (1956).

DUYSENS, L. N. M.: On the structure and function of the primary reaction centers of photosynthesis. Arch. Biol. (Liège) 76, 251-275 (1965).

FÖRSTER, Th.: Ein Beitrag zur Theorie der Photosynthese. Z. Naturforsch. 2b, 174-182 (1947).

FOGG, G. E.: The gas-vacuoles of the myxophyceae (cyanophyceae). Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc. 16, 205-217 (1941).

FOGG, G. E.: The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae. Bacteriol. Revs. 20, 148-165 (1956).

FOGG, G. E., and M. WOLFE: The nitrogen metabolism of the blue-green algae. In FRY, B. A., and J. L. PEEL (Eds.): "Autotrophic Microorganisms". Cambridge University Press, 1954, Cambridge, England, pp. 99-125.

GASSNER, E. B.: On the pigment absorbing at 750 mμ occuring in some blue-green algae. Plant Physiol. 37, 637-639 (1962).

GESSNER, F.: "Hydrobotanik. Band I. Energiehaushalt." Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1955.

GOEDHEER, J. C.: Fluorescence bands and chlorophyll a forms. Biochim. Biophys. Acta 88, 304-317 (1964).

GOVINDJEE, C. CEDERSTRAND, and E. RABINOWITCH: Existence of absorption bands at 730-740 and 750-760 millimicrons in algae of different divisions. Science 134, 391-392 (1961).

GOVINDJEE, E. RABINOWITCH, and J. B. THOMAS: Inhibition of photosynthesis in certain algae by extrem red light. Biophys. J. 1, 91-97 (1960).

GRANICK, S.: Magnesium protoporphyrin monoester and porchyrin monomethyl ester in chlorophyll biosynthesis. J. of Biol. Chem. 236, 1168-1172 (1960).

VON DER HAAR, F. G.: Über die massenspektroskopische Analyse von Prophyrinen und Chlorinen. Dissertation. Braunschweig 1966.

HARDER, R.: Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen Nostoc puntiforme. Z. Botan. 9, 145-242 (1917).

HAXO, F., and L. R. BLINKS: Photosynthetic action spectra of marine algae. J. Gen. Physiol. 33, 389-422 (1950).

HECKER, E.: "Verteilungsverfahren im Laboratorium". Verlag Chemie, GMBH., Weinheim/Bergstr. 1955.

KATZ, J. J., R. C. DOUGHERTY, and L. J. BOUCHER: Infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy of chlorophyll. In L. P. VERNON and G. R. SEELY (Eds.): "The Chlorophylls". Academic Press, New York-London 1966, pp. 185-251.

KIN, W. S.: Complete fractionation of bacteriochlorophyll and its degradation products. Biochim. Biophys. Acta 112, 392-402 (1966).

KOK, B.: Partial purification and determination of oxydation-reduction potential of the photosynthetic chlorophyll complex absorbing at 700 mu. Biochim. Biophys. 48, 527-533. (1961).

KRASNOVSKII, A. A.: Photochemistry and spectroscopy of chlorophylls, bacteriochlorophyll, and bacterioviridin in model systems and photosynthetizing organisms. Photochem. Photobiol. 4, 641-655 (1965).

KRASNOVSKII, A. A.,and C. M. KOSOBUTSKAYA: Different conditions of chlorophyll in plant leaves. Dokl. Akad. Nauk. SSSR 91, 343-346 (1953).

KRATZ, W. A., and J. MEYERS: Nutrition and growth of several blue-green algae. Amer. J. Bot. 42, 282-287 (1955).

KUBELKA, P. und F. MUNK: Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Z. techn. Phys. 12, 593-601 (1931).

KUHN, E.: Methoden zur Aufnahme des Reflexionsspektrums lebender Chlorella-Zellen. Staatsexamensarbeit, Tübingen (1964).

LEWIN, R. A.: "Physiology and Biochemistry of Algae". Academic Press, New York-London, 1962.

LEVITT, J.: Frost, drought, and heat resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. 2, 245-268 (1951).

LIPPINCOTT, J. A., J. AGHION, E. PORCILE, and W. BERTSCH: The preparation and characterization of chloroplast fragments having an absorbancy maximum at 7400 A. Arch. Biochem. Biophys. 98, 17-27 (1962).

LORENZEN, H.: Synchronization of Chlorella with light-dark changes and periodical dilution of the population to a standard cell number. In E. ZEUTHEN (Edit.):"Synchrony in Cell Division and Growth". Interscience Publ., New York-London-Sidney 1964.

MEIER, H.: "Die Photochemie der Organischen Farbstoffe". Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963.

METZNER, H.: Spektralphotometrische Messungen an gefriergetrockneten Chlorella-Zellen. In "Microalgae and Photosynthetic Bacteria". The University of Tokyo Press, Tokyo 1963, pp. 227-237.

METZNER, H.: Spektroskopische Messungen an lebenden Algenzellen. In J. B. THOMAS und J. C. GOEDHEER (Eds.):"Currents in Photosynthesis". Ad. Donker Publ., Rotterdam 1966a, pp. 17-28.

METZNER, H.: Untersuchungen zur Chlorophyll-Absorption in vivo. Z. Pflanzenphysiol. 54, 183-194 (1966 b).

METZNER, H., K. FISCHER und S. STRUSS: Zur Anwendung der Gegenstromverteilung in der cytochemischen Forschung. (Russ.) Biochimija (im Druck).

METZNER, H. und H. SENGER: Beeinflussung synchroner Chlorella-Kulturen durch Streptomycin und Diphenylamin. Vortr. a. d. Gesamtgeb. d. Bot., N. F. 1, 217-223 (1962).

METZNER, H. und S. STRUSS: Gewinnung reiner Chlorophyll a-Präparate durch Gegenstromverteilung von Algenextrakten. Z. Naturforsch. 18b, 707-710 (1963).

NAKAMURA, H.: Über die Kohlensäureassimilation bei niederen Algen in Anwesenheit des Schwefelwasserstoffs. Acta phytochim. (Japan) 10, 271-281 (1938).

NISHIZAKI, Y: Realtion between the Hill reaction activity of chloroplasts and shifts of their absorption maximum with addition of methanol. Plant Cell Physiol. (Tokyo) 5, 373-376 (1964).

NULTSCH, W. und G. RICHTER: Aktionsspektrum des photosynthetischen $^{14}CO_2$-Einbaus von Phormidium uncinatum. Arch. f. Mikrobiol. 47, 207-213 (1963).

PERKINS H. J., and D. W. A. ROBERTS: On the relative intensities of the "blue" and "red" absorption bands of chlorophyll a. Biochim. Biophys. Acta 79, 20-29 (1964).

PRINGSHEIM, E. G.: The relationship between bacteria and and myxophyceae. Bacteriol. Revs. 13, 47-98 (1949).

RAUEN, H. M. und W. STAMM: "Gegenstromverteilung". Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1953.

SEYBOLD, A. und EGLE K.: Quantitative Untersuchungen über Chlorophyll und Carotinoide der Meeresalgen. Jb. wiss. Bot. 86, 50-80 (1938).

SHIBATA, K, A. A. BENSON, and M. CALVIN: The absorption spectra of suspensions of living microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 15, 461-470 (1954).

SIEGELMAN, H. W., B. C. TURNER, and S. B. HENDRICKS: The chromophore of phytochrom. Plant Physiol. 41, 1289-1292 (1966).

SIRONVAL, C., M. R. MICHEL-WOLWERTZ, and A. MADSEN: On the nature and possible functions of the 673- and 684 mμ forms in vivo of chlorophyll. Biochim. Biophys. Acta 94, 344-354 (1965).

STAHL, E.: "Dünnschichtchromatographie." 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.

STOLL, A. und E. WIEDEMANN: Die kristallisierten Chlorophylle a und b. Helv. Chim. Acta 42, 679-683 (1959).

STRAIN, H. H., and W. M. MANNING: Isomerization of chlorophylls a and b. J. biol. Chem. 146, 275-276 (1942).

STRAIN, H. H., J. SHERMA, and M. GRANDOLFO: Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents. Analyt. Chem. 39, 926-932 (1967).

TERPSTRA, W.: Investigation on Chenopodium chlorophyll-protein CP 668. In J. B. THOMAS and J. C. GOEDHEER (Eds.): "Currents in Photosynthesis". Ad. Donker Publ. Rotterdam, 1966, pp. 157-164.

THOMAS, J. B.: Structure of the red absorption band of chlorophyll a in Aspidistra elatior. Biochim. Biophys. Acta 59, 202-210 (1962).

THOMAS, J. B.: Shape of the red absorption band of chlorophyll a in algae lacking chlorophyll b. Colloq. Intern. Centr. Natl. Rech. Sci. Paris No 119, 287 (1963).

THOMAS, J. B., J. W. KLEINEN HAMMANS, and W. J. ARNOLDS: Studies on the red absorption band of chlorophyll in vivo. Biochim. Biophys. Acta 102, 324 (1965).

THOMAS, J. B., and U. P. VAN DER WAL: Absorption responses of chlorophyll in vivo to treatment with acetone. Biochim. Biophys. Acta 79, 490-499 (1964).

TILDEN, J. E.: A classification of the algae based on evolutionary development, with special reference to pigmentation. Botan. Gaz. 95, 59-77 (1933).

WASSING, E. C., E. KATZ und R. DORRESTEIN: Infrarot-Absorptionsspektrum verschiedener Stämme von Purpurbakterien. Enzymologia 7, 113-120 (1939).

WETHERELL, H. R., M. J. HENDRICKSON, and A. R. McINTYRE: Infrared spectra of chlorophyll derivatives. J. Amer. Chem. Soc. 81, 4517-4520 (1959).

WINTER, G.: Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch endophytische Blaualgen. Beitr. Biol. Pflanz. 23, 295-335 (1935).

WINTERMANS, J. F. G. M., and A. DE MOTS: Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. Biochim. Biophys. Acta 109, 448-453 (1965).

YAKUSHIJI, E., K. UCHINO, Y. SIGIMURA, I. SHIRATORI and F. TAKAMIYA: Isolation of water soluble chlorophyll protein from leaves of Chenopodium album. Biochim. Biophys. Acta 75, 293-305 (1963).

Lebenslauf

Am 1. Juni 1941 wurde ich, Karin Rosalie Fischer, als Tochter des Apothekers Kurt Fischer (gefallen 1945) und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Skradde (Apothekenhelferin) in Berlin geboren. Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule in Berlin-Kreuzberg; im April 1951 wurde ich in die Franziskus-Oberschule (Berlin-Schöneberg) aufgenommen, an der ich im Februar 1960 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend war ich als Apotheken-Praktikantin tätig. Im Oktober desselben Jahres gab ich die zum Pharmazie-Studium führende Ausbildung auf und begann im Wintersemester 1960/61 an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Biologie. Nach sechs Semestern setzte ich mein Studium in Botanik (Pflanzenphysiologie), Zoologie, Organischer Chemie und Mikrobiologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen fort.-

Vom Wintersemester 1964/65 bis zum Ende des Sommersemesters 1967 arbeitete ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Metzner im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie an der vorliegenden Dissertation: "Untersuchungen über das Chlorophyll und das Begleitpigment "P 750" der Cyanophycee Anacystis nidulans."

Meine akademischen Lehrer waren insbesondere: Frau Professor Ch. Thielke und Herr Professor W. Ulrich (Berlin), sowie die Herren Professoren E. Bayer, E. Bünning, H. Metzner und H. Zähner (Tübingen).

Foto-Druck aku 86 BAMBERG Schiffbauplatz 4 b Telefon (0951) 22778
Fotodruck und Verlag wissenschaftlicher Publikationen